

现代生物化学方法

〔苏〕B. H. 奥列霍维奇等编著

袁厚积 赵邦悌 合译



人 民 科 学 出 版 社

内 容 简 介

本书由苏联医学科学院院士 В. Н. Орехович 主编，全书分 68 节，每节都叙述一个或几个现代生物化学常用的方法，这些方法中包括近年发展起来的一些十分重要的生化技术，诸如亲和层析、免疫化学、mRNA 纯化及蛋白质的合成等。对每个方法的原理进行了扼要的介绍，并对操作过程作了详细的叙述。此外，还附有大量参考文献。本书可供从事生物化学及临床生物化学工作者参考。

58.173
653
U)

现代生物化学方法

[苏] B. H. 奥列霍维奇等编著

袁厚积 赵邦梯 合译



人 民 大 学 出 版 社

中科院植物所图书馆



S0017410

译者前言

《现代生物化学方法》一书是由苏联医学科学院院士 В. Н. Орехович 主编的,全书分 68 节,每节都叙述一个或几个现代生物化学常用方法。这些方法大体上可以分成三类:一类是人及动物组织中与含氮物质及碳水化合物氧化有关的酶与产物的研究法。一类是具有生物活性的多肽与蛋白质及与这类物质代谢有关的酶类的研究法。一类是动物组织中蛋白质生物合成的研究法。这些方法中包括近年发展起来的一些十分重要的生物化学方法,例如:亲和层析、免疫化学技术、mRNA 的纯化法、蛋白质合成的无细胞体系等等。每个方法都是由从事这方面工作的专家撰写的,所以对实验操作中的一些重要细节也一一作了叙述,使读者应用这些方法时格外方便。

本书可供从事生物化学及临床生物化学的工作者参考之用。

全书由袁厚积(复旦大学)与赵邦悌(北京大学)两人合译。第一部分及第二部分的前 7 节由赵邦悌翻译,袁厚积校对,其余部分由袁厚积翻译,赵邦悌校对。由于水平所限,错误之处在所难免,希读者批评指正。

一九八〇年七月

目 录

序言.....	1
---------	---

第 一 部 分

氮代谢、氧化及碳水化合物代谢的酶类的研究法	1
-----------------------------	---

二胺氧化酶活力的比色测定法

——М. И. Турков, Г. И. Климова, Г. А. Давыдова, К. М. Ермолаев, В. З. Горкин.....	1
---	---

猪肾二胺氧化酶的提纯

——Л. Н. Стесина	5
-----------------------	---

猪肾二胺氧化酶提纯的改良法

——Г. И. Климова	8
-----------------------	---

用二氯异三聚氰酸反应测定线粒体单胺氧化酶的活力

——Р. С. Кривченкова.....	11
--------------------------	----

用对-硝基苯乙胺作底物测定单胺氧化酶的活力

——Г. Д. Исаханян, Ж. И. Акопян	14
--------------------------------------	----

动物组织线粒体单胺氧化酶的溶解及纯化

用无离子去污剂溶解和纯化公牛脑组织单胺氧化酶

——Т. А. Москвитина	16
--------------------------	----

用无离子去污剂溶解与纯化公牛肝脏单胺氧化酶

——Ж. И. Акопян	20
----------------------	----

用超声波与无离子去污剂联合溶解和纯化大鼠肝脏单胺氧化酶

——И. С. Северина.....	24
-----------------------	----

用丁酮溶解和纯化猪肝单胺氧化酶

——И. С. Северина.....	28
-----------------------	----

测定腺苷酸脱氨酶活力的电位滴定法

——В. А. Пеккель, Ж. И. Акопян	31
大鼠骨骼肌腺苷酸脱氨酶的纯化	
——Ж. И. Акопян, А. З. Киркель	34
线粒体悬浮液中琥珀酸脱氢酶活力的测定	
——Р. С. Кривченкова	37
线粒体悬浮液中细胞色素氧化酶活力的测定	
——Р. С. Кривченкова	39
肝脏微粒体组分的分离及其氧化系统的特性	
——И. И. Карузина, А. И. Арчаков	42
动物组织中脂类物质的某些过氧化产物的测定方法	54
不饱和高级脂肪酸二烯酮合作用的测定方法	
——И. Д. Стальная	55
用硫氰酸铵测定脂类过氧化物的方法	
——Л. А. Романова, И. Д. Стальная	56
用硫巴比妥酸测定丙二酸二醛的方法	
——И. Д. Стальная, Т. Г. Гаршвили	58
用大肠肝菌色氨酸酶蛋白测定 5'-磷酸吡哆醛的微量酶学方法	
——Ю. В. Букин, А. В. Сергеев	60
测定哺乳动物及人体组织中磷酸吡哆醛激酶活力的微量方法	
——Ю. В. Букин	67
哺乳动物组织中丝氨酸羟甲基转移酶活力的测定	
——А. В. Сергеев	72
尿及血清中精氨酸含量的测定方法	
——Л. П. Алексеенко	77
生物体液及组织中 pH, pNa ⁺ , pK ⁺ 的动力学研究	
——Е. А. Юматов	82
糖原磷酸化酶活力的测定	
——Е. В. Раменский	89
用葡聚糖凝胶(Sephadex)亲和层析从人体及动物组织中分离	

酸性 α -葡萄糖苷酶(γ -淀粉酶)的方法	
——Д. М. Беленький	94
经聚丙烯酰胺凝胶电泳后的酶制剂中酸性 α -葡萄糖苷酶 (γ -淀粉酶)的麦芽糖酶活力和葡萄糖淀粉酶活力的测定方法	
——Д. М. Беленький	98
游离的及结合的 6-脱氧己糖的测定方法	
——Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба	103
生物体液酮糖的测定	
——В. К. Городецкий, В. И. Михайлов	110
人肠粘膜二糖分解酶类活力的测定	
——И. С. Лукомская	116
用于胎儿期 Tay-Sachs 症诊断及检出疾病的杂合子携带者的 N-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶A活力的测定法	
——И. В. Цветкова, А. Б. Козина	120
糖原积累症的生化诊断方法	
——И. А. Папова, И. В. Чибисов	124

第 二 部 分

生物活性肽、蛋白质及参与这些肽及蛋白质代谢的酶的研究方法	135
根据血管紧张肽 I 的三肽测定人血清中羧基组织蛋白酶(肽酰-二肽酶)的活力的灵敏荧光法	
——Л. В. Павлихина, Ю. Е. Елисеева, В. Ф. Позд-нев, В. Н. Орехович	135
从蛋白质胶(生产人 γ -球蛋白时的废渣)提取血管紧张肽原	
——Л. П. Алексеев	139
人血清(血浆)中激肽释放酶和激肽释放酶原的定量测定	
——Т. С. Пасхина, А. В. Кринская	145
从人血清制备部分纯化的激肽释放酶制剂	

——А. В. Кринская, Т. С. Пасхина.....	150
从兔血清制备高度纯化的激肽原	
——Т. П. Егорова, Л. Г. Макевнина, Е. Б. Россинская, Т. С. Пасхина	158
人血中羧肽酶N(激肽酶I)的酯酶活力的测定。马尿酸-L-精氨酸的合成	
——С. С. Трапезникова, Е. Б. Россинская, Б. Л. Крайнова, Е. С. Чаман, Т. С. Пасхина	167
人血清抗胰蛋白酶活力的测定	
——В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина	176
从兔血清制备高度纯化的热稳定和酸稳定的胰蛋白酶抑制剂	
——В. Ф. Нартикова, О. Г. Оглоблина, Р. И. Якубовская, Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина.....	179
新的测定蛋白酶活力的微量方法	
——Л. П. Алексеенко.....	192
亲和层析(生物学上专一的层析)	
——О. В. Казакова	201
用5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸比色法测定蛋白质的-SH基和-S-S-键	
——И. В. Веревкина, А. И. Точилкин, Н. А. Попова	209
生物多聚物经醋酸纤维素薄膜超过滤	
——Л. В. Воробьев, Р. И. Гвоздев	217
鱼精蛋白硫酸盐商品制剂的纯化和利用它们来提取核酸、酸性和碱性蛋白	
——Р. И. Гвоздев, А. В. Татьяненко, З. П. Белова, А. П. Садков.....	222
血红蛋白的醋酸纤维素电泳	
——О. В. Троицкая.....	227

用超离心法分离人血清脂蛋白的组分	
——Е. Н. Левитова	233
从菜豆种子中提取植物血球凝集素	
——И. М. Карманский	238
测定植物血球凝集素的淋巴细胞刺激活性的方法	
——Н. Н. Голубева	241
根据羟脯氨酸测定胶原蛋白含量的方法	
——Т. В. Замаева	246
以 ¹⁴ C-羟脯氨酸的测定作为模式体系研究胶原蛋白合成的 一个方法	
——Т. В. Замаева	248
胶原蛋白脯氨酸-羟化酶活力的测定	
——Т. В. Замаева	253
从细菌胶原蛋白酶除去其他蛋白质水解酶杂质的方法	
——А. Е. Берман, Т. А. Оборотова	256

第 三 部 分

研究动物细胞蛋白质合成系统的方法	260
多肽链合成时间的测定方法	
——В. Л. Лейтин, М. И. Лерман	260
能阻碍动物细胞蛋白质合成系统的抗癌化合物的作用机理分 析方法	
——О. Ю. Абакумова	268
分离单种多聚核糖体的免疫化学方法	
——Е. В. Сидорова, М. Г. Трудюлюбова	275
提取游离的和与细胞质网膜结合的多聚核糖体的方法	
——А. Е. Берман	283
从 80 S 核糖体制备有生物活性的核糖体亚基的方法	
——О. Ю. Абакумова	285

心肌核糖体的提取与研究	
——М. П. Явич	291
动物细胞的亚细胞组分中 RNA 和 DNA 的定量测定	
——М. Г. Трудюлюбова	296
从哺乳动物细胞中提取和纯化含有多聚(A)的 mRNA 的方法	
——Е. В. Любимова, О. В. Подобед	298
心肌 RNA 分解过程的研究	
——М. П. Явич	304
动物细胞质膜的提取	
——А. В. Поспелова	308
细胞质网膜的提取法	
——А. Д. Златопольский	310
鼠的唾液腺神经组织生长因子的提取	
——Н. А. Кузьмичева	317
用微孔滤膜分级分离标记的细胞大分子的方法	
——О. Ю. Абакумова	320
放射自显影方法	
——И. Д. Беляева	325
大鼠肝脏组蛋白的分级分离	
——Н. В. Смирнова	330
胶原蛋白和其他蛋白质生物合成的无细胞微粒体系统	
——А. Е. Берман	333
Krebs-2 腹水癌细胞无细胞蛋白质合成系统	
——Т. Ю. Угарова	338
附录	350
参考文献	352

序 言

在1964和1968年由苏联医学科学院生物化学和医学化学研究所编写出版了《生物化学现代方法》丛书中的两本书，在第一本书的序言中指出，生物化学方法的数量很大，并且它们的数量每年都有增加，至于某些很有名的方法的改良法就更多了。毫无疑问，随着许多新方法的出现，大量的过去所发表的方法由于其专一性差，不够灵敏，过分的复杂性或者某些试剂难以得到而已失去其本身的意义。要把杂乱无章的一大堆方法介绍阐述清楚，对从事某一方面生物化学研究的大专家来说也是困难的，而对年轻的研究人员来说要独立的完成此项任务更是困难。考虑到上述原因，研究所提出了有系统地出版这套书的任务，在这套丛书内论述了生物化学研究最有效和最专一的方法。

第一卷有廿六篇，在这当中详细地叙述了蛋白质和核酸以及这些生物高分子物质的基本组成成分的主要提取方法和物化性质。

这套丛书的第二卷专门叙述亚细胞结构和细胞化学成分及生物体体液的测定方法和性质鉴定。

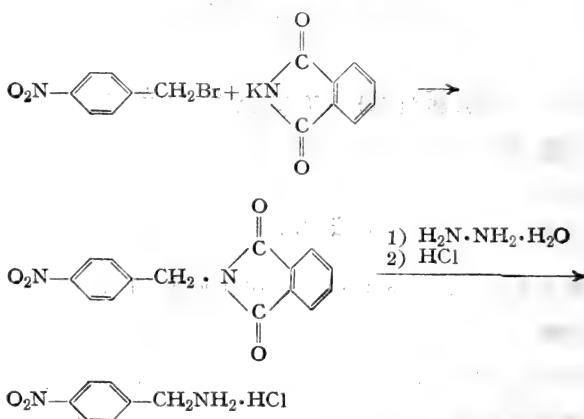
第三卷材料所叙述的特点根本上有别于上述二卷，如果在第一、二卷大部分章节中是叙述各个方法以及综合方法的理论基础，和详细地叙述关于所用仪器的实际数据等等，那么在第三卷中是以非常扼要的形式着重注意叙述实验技术，这样就有可能叙述68种方法而不是象过去所出版的两卷中每卷内仅能叙述20~25种方法。蛋白质生物合成机理研究方面活跃的研究工作促进了新方法的建立，这些新方法能更有效和高质量地解决这个问题。因此，

乙醇(96%)。

盐酸—浓盐酸、10%盐酸及 0.1 M 盐酸。

苯邻二酰亚胺钾。

4-硝基苄基胺盐酸盐的制备



将 2.16 克(0.01M)4-硝基苄基溴(纯,用乙醇重结晶,熔点为 90~100°C)溶于 20 毫升新重蒸的 N,N-二甲基甲酰胺中,并在室温中与 1.85 克(0.01M)的苯邻二酰亚胺钾(悬浮在 10 毫升 N,N-二甲基甲酰胺中)相混合。反应温度提高到 45°C。将反应混合物在室温中放置过夜,过滤除去溴化钾沉淀,将滤液在真空中蒸发浓缩。将残留物(1.6 克)转移到一个带有搅拌器、冷凝管及滴液漏斗的三角烧瓶中,加入 30 毫升乙醇,加热至沸,在充分搅拌下,用滴液漏斗逐滴加入 5 毫升水合苯肼的乙醇溶液(0.5 克水合苯肼溶于 5 毫升乙醇中)。可以见到有白色乳酪状沉淀形成。然后加入 5 毫升浓盐酸,沸腾 3 小时。冷却至室温后将沉淀过滤,并将滤液加热,蒸发至干。将残留物(900 毫克)溶于 20 毫升水中,用碱的水溶液使它碱化到 pH 10.0,用乙醚抽提。将乙醚抽提液(30 毫升)合并后,将它与 15 毫升 10% 的盐酸一起振荡。将酸性抽提液

在真空中蒸发至干燥，将残留物在乙醇中结晶，得到 400 毫克(理论值的 23%) 白色片状结晶的 4-硝基苄基胺盐酸盐，其熔点为 $250\sim 252^{\circ}\text{C}$ 。

实验测得的数值(%): N——14.69; 14.90%; $\text{C}_7\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ 。计算值(%): N——15.07%。

4-硝基苯醛-4-硝基苯胂的制备

将 0.31 克(0.002 M)4-硝基苯醛和 0.31 克(0.002 M)4-硝基苯胂的混合物在 15 毫升乙醇中煮沸 5 分钟。冷却后，滤出胂的结晶，用乙醇洗涤后，再用乙醚加以洗涤，产率为 0.55 克(占理论值的 96.5%)。用 90 毫升正丙醇加以结晶后得到 0.45 克橙色结晶，熔点为 249°C 。

不含羰基化合物的乙醇的制备

0.5 升 96% 乙醇中加入 0.5 克 2,4-二硝基苯胂及数滴浓盐酸。将此混合物在一个带有冷凝管的一升烧瓶中在 $78\sim 79^{\circ}\text{C}$ 加热 10 小时。然后，在此同一温度下蒸馏除去乙醇(用砂浴或电炉丝上加有罩子的电炉!)。

4-硝基苯醛的测定

在几个磨口试管中各加入含有 4-硝基苯醛(每毫升 25 nM)的 0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)0.4 毫升。对照管中加入相同体积的但不含 4-硝基苯醛的缓冲液。再在实验及对照管中各加入 0.2 毫升 0.1 M 盐酸(每毫升中含有 4-硝基苯胂 1500 nM)，及 0.30 毫升蒸馏水。试管中的 pH 值应为 2.5。用玻璃塞紧塞试管，摇匀后在 45°C 的水浴中保温 1 小时。然后各试管中加入 1.5 毫升不含羰基化合物的乙醇和 0.10 毫升 50% 氢氧化钾，仔细摇匀，

5~10 分钟后, 在波长 590 nm 下测量其光密度 (以对照管作空白)。根据标准曲线 (图 1) 确定样品中 4-硝基苯醛的含量。此标准曲线是根据人工合成的 4-硝基苯醛-4-硝基苯胺溶液在同样的条件下所测定的光密度值而制作的。

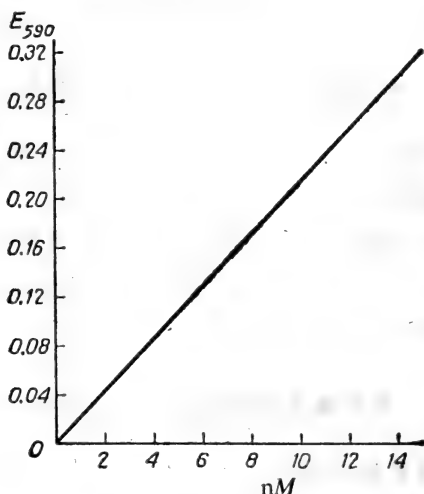


图 1 测定 4-硝基苯醛含量的标准曲线
纵座标—— E_{590} , 即 590nm 下的光密度; 横座标
——试样中 4-硝基苯醛的含量, 以 nM 表示

用 4-硝基苄基胺作为底物测定二胺氧化酶的活力

可用比活力为每毫克蛋白质在一分钟内可以氧化 400 nM 丁二胺的二胺氧化酶纯品作为研究材料的实例 (E. B. Горяченкова и др., 1967)。

在磨口试管中加入 0.05 毫升研究材料 (5 微克二胺氧化酶纯制剂)、0.4 毫升 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 及 0.05 毫升 4-硝基苄基胺水溶液 (每毫升 5000 nM), 最终体积为 0.5 毫升。加磨口塞子, 在 37°C 水浴中保温 20 分钟。保温后, 试管中加入 4-硝

基苯肼盐酸溶液以终止酶反应。盐酸的浓度应事先计算好，使它正好能将试样的 pH 值调到 2.5。对照组中加入底物及 4-硝基苯肼后，即将酶失活后再保温。

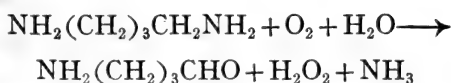
根据试样中 4-硝基苯醛形成的量来确定二胺氧化酶之活力。4-硝基苯醛的测定法如前面所述。

猪肾二胺氧化酶的提纯

Л. Н. Стесина

二胺氧化酶活力的测定

原理 根据二胺氧化酶所催化的丁二胺(腐胺)-[1, 4]的氧化反应进行测定:



反应产物 4-氨基丁醛由于分子内的缩合而形成 Δ' -吡咯啉 (二氢吡咯), Δ' -吡咯啉再与邻-氨基苯甲醛作用形成有颜色的化合物, 它在 430 nm 处有最大的吸收(Holmstedt et al., 1961)。

试剂 50 mM 丁二胺(丁二胺-[1, 4]·2HCl)。饱和的邻-氨基苯甲醛水溶液。0.067 M 磷酸钠钾缓冲液(pH 7.5)。50% 三氯乙酸(TCA)。

操作过程 试管中加入 1 毫升缓冲液, 0.2 毫升丁二胺, 0.5 毫升饱和邻氨基苯甲醛水溶液, 0.05~0.2 毫升酶液, 用水补足至 2.8 毫升。将试样用氧饱和 1~2 分钟后在 37°C 保温 20~40 分钟(时间的长短取决于酶的活力)。加入 0.2 毫升 50% TCA 以终止反应。离心分离出沉淀在波长 430 nm 下测定其光密度(用 10 mm 比色杯, CФ-16 分光光度计)。以不加底物的试样作为对照。

按形成的氨量计算出已被氧化的丁二胺的量。氨量则按标准

曲线测定。所列的标准曲线是用含邻-氨基苯甲醛的试样中光密度的变化对在同一试样中用等温蒸馏后再用奈氏试剂处理的方法测得的氮量的曲线。

在上述试验条件下在 1 分钟内能催化氧化 1 nM 丁二胺的酶量定为二胺氧化酶的一个活力单位。以每毫克蛋白质所具有的活力单位表示比活力。蛋白质的浓度用克氏定氮法或按 Lowry 等 (1951) 的方法测定。

酶的提纯

从猪肾皮层的匀浆分离二胺氧化酶。分离的步骤包括：有控制的加热、硫酸铵盐析、DEAE-纤维素吸附、氢氧化铝凝胶吸附 (E. B. Горяченкова и др., 1967) 及生物凝胶 p-300 过滤。

匀浆的制备 新鲜的 (或在 -20°C 下贮存但不超过 10~12 天的) 猪肾，除去髓质后在 Waring 匀浆器中在 100 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 6.8$) 中匀浆 5 分钟。应用 50% 的匀浆。

加热 所得匀浆在不断搅拌下在 60°C 水浴中加热 20 分钟。在 4000 g 下离心 10 分钟除去变性蛋白及细胞碎片的沉淀。

硫酸铵分级分离 向所得上清液在不断的搅拌和控制 pH 值的情况下加入结晶硫酸铵至 0.35 饱和度。加入 4% 的氨水使 pH 值保持在 6.8 。加完硫酸铵后放置 3~4 小时，然后以 4000 g 离心 10 分钟，弃去沉淀，向上清液加入硫酸铵至 0.50 饱和度，放置 3~4 小时， 4000 g 离心 10 分钟，弃去上清液，然后将沉淀溶解于最小体积的 100 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 6.8$) 中。

再次加热 将所得酶液在 58°C 的水浴中在不断的搅拌下加热 10 分钟。然后 4000 g 离心 15 分钟以除去变性杂蛋白。将上清液对 100 mM 磷酸缓冲液 ($\text{pH } 7.0$) 透析至除尽铵离子为止。

DEAE-纤维素处理 将 DEAE-纤维素事先用 10 mM 磷酸

缓冲液 (pH 7.0) 加以平衡, 按照 10~15 克干 DEAE-纤维素对 1.5~2.0 克蛋白质的比例将纤维素加入透析后的酶液中。30 分钟后经布氏漏斗过滤得到 DEAE-纤维素。用递增浓度的磷酸缓冲液 (pH 7.0, 10、30、60、80、100 mM) 将酶蛋白从 DEAE-纤维素上洗脱下来。用 60 mM 及 80 mM 磷酸缓冲液洗脱下来的组分中含有 DEAE-纤维素处理之前的起始样品中酶活力的 90~95%。

氢氧化铝凝胶 C₇ 处理 将具有二胺氧化酶活力的组分合并, 加入氢氧化铝凝胶, 使蛋白质量与凝胶干物质质量之比为 2:1。搅拌 30 分钟后, 将试样在 2000 g 离心 5 分钟, 上清液中无二胺氧化酶活力, 弃去。用递增浓度的磷酸缓冲液 (pH 7.6, 10、15、20、25、35、40 mM) 在不断搅拌 15~20 分钟后, 用 2000 g 离心 15 分钟, 将酶蛋白从凝胶上洗脱下来。用 25、30 及 35 mM 缓冲液抽提出来的组分中含有二胺氧化酶的活力。将这些组分合并, 对 100 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 透析 5~6 小时。

再次用氢氧化铝凝胶 C₇ 处理 向透析后所得的酶液加入氢氧化铝凝胶 C₇, 加入的凝胶量按照蛋白质与凝胶干物质之比为 3:1 计算。搅拌 40 分钟后, 将试样离心 5 分钟 (2000 g), 弃去上清。吸附在凝胶上的蛋白质用递增浓度 (125、150、175、200、225、250 mM) 的最小体积的磷酸缓冲液将它洗脱下来。洗脱时, 将不同浓度的缓冲液与凝胶一起搅拌 15 分钟, 于 2000 g 离心 5 分钟。

用 175、200、225 及 250 mM 缓冲液抽提出来的蛋白质组分中含有起始匀浆中二胺氧化酶活力的 70~75% (表 1)。

生物凝胶 P-300 柱层析 在一个体积为 45 毫升 (1.5×30 厘米) 装有生物凝胶 P-300 并事先用 10 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.6) 洗过的柱子上, 加上 1.2 毫升 (3.2 毫克蛋白质) 第二次 C₇ 纯化后的样品。然后用 100 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.6) 洗脱, 流速每分钟 0.05

毫升。用自动分部收集器每 1 毫升收集一管。组分 8~12 含有二胺氧化酶的最高活力，占匀浆中酶活力的 1.5~2.0%。这一步使酶的比活力比起始匀浆中的比活力提高达 3500~4000 倍（见表 1）。

表 1 猪肾二胺氧化酶的提纯(实验例)

纯化阶段	组 分 的 鉴 定						
	体 积 (毫升)	活力*(单位/ 毫升)	总活力 (单位)	蛋白质浓 度(毫克/ 毫升)	比活力 (单位/ 毫克)	产 率 (%)	提纯程度
匀 浆	4000	33	132000	141.5	0.2	100	1
加 热	1600	80	128000	58	1.3	97	6.5
硫酸铵分级分离	200	136	27200	37	3.6	20.4	18
再 加 热	200	134	26800	32.5	4.1	20	20.5
DEAE- 纤维素处理	250	75	18750	4.5	16.6	14	83
氢氧化铝凝胶 C _r 处理	90	133	11970	1.3	103	9.1	515
再一次 C _v 处理	30	346	10320	0.7	494	8	2470
生物凝胶 P-300 柱层析	9	81	729	0.1	810	0.55	4050

* 二胺氧化酶的活力单位规定为：在 1 mM 磷酸缓冲液(pH7.5)中，37°C 下 1 分钟内能使 1mM 丁二胺氧化的酶量为一个活力单位。

所得酶制剂用聚丙烯酰胺凝胶区带电泳分析只出现一条分得很清晰的蛋白质条带。

猪肾二胺氧化酶提纯的改良法

Г. И. Климова

当有邻氨基苯甲醛存在时，丁二胺氧化脱氨基时有 2,3-三甲叉-1,2-唑啉(最高吸收在 430 nm)的形成，根据这一点来测定二胺氧化酶的活力(Holmstedt et al., 1961)。

酶的纯化

为了省掉 58°C 加热这一步, 对由 Л. Н. Стесина (Ж. И. Акопян и др., 1972, 也可见本书第一部分第一节) 改进后的从猪肾制备二胺氧化酶的方法 (Е. В. Горяченкова и др., 1967) 作了一些改进。这就有可能得到每克分子蛋白质带有 4~8 个—SH 基的酶制剂, 而用加热法所得的制剂—SH 基的含量不会超过 4 个。

为了得到高纯度的酶制剂, 在纯化的最后一步采用了硫酸铵溶液“反抽提”的方法 (Jakoby, 1968)。

匀浆的制备

所有操作在 5~6°C 下进行。将 1600 克肾的皮层 (新鲜的或于 -20°C 贮存 1~2 星期的) 分批与 1600 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 在 PT-1 型匀浆器中匀浆 3 分钟, 然后离心 (35000 g) 45 分钟。弃去沉淀。

硫酸铵分级分离

在上清液中加入结晶硫酸铵至 0.43 饱和度。添加 4% 氢氧化钠溶液使 pH 保持在 7.0 左右, 在冷处放 2.5 小时 (或放过夜), 然后离心 (20000 g) 20 分钟。向上清液加入硫酸铵至 0.53 饱和度, 再离心一次。将所得沉淀溶解于 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 并对此缓冲液透析 18 小时, 其间更换缓冲液 4~5 次。如果在透析时出现不溶解的物质, 就离心除去 (35000 g, 20 分钟)。

DEAE-纤维素吸附

将事先用 0.01 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤过的 DEAE-纤维素 (Cl⁻型) 30~35 克 (干物质) 加到透析后的酶液中。在冷处放置

40 分钟后(不时地加以搅拌),用布氏漏斗分离出纤维素。用递增浓度(0.01、0.03、0.06、0.08、0.10M)磷酸缓冲液(pH 7.0)各 200~250 毫升与 DEAE-纤维素搅拌均匀以洗脱二胺氧化酶。

第一次氢氧化铝凝胶吸附

将具有二胺氧化酶最高活力的几个组分合并,并使其吸附于氢氧化铝凝胶上。对每种凝胶制剂要在“正”吸附的情况下预先测定酶蛋白与凝胶干物质的最适比例。表 2 的纯化实验中采用 1:2 的比例。将吸附剂加入酶溶液之前应离心(2500 g, 2 分钟)除去凝胶中多余的水分。

将悬浮液间歇搅拌 40 分钟后离心,用 50~60 毫升 0.15~0.45 M 递增浓度磷酸缓冲液(pH 7.6)分段洗脱吸附于氢氧化铝凝胶上的蛋白质(下一次分段洗脱时的缓冲液浓度要比上一次的提高 0.05M)。在间歇搅拌下洗脱 10 分钟后离心。

将具有二胺氧化酶最高比活力的组分合并后对 0.01 M 磷酸缓冲液(pH 7.0)透析过夜。

第二次氢氧化铝凝胶吸附

向透析后的酶液加入一定数量的氢氧化铝凝胶,使透析后的酶液中蛋白质与凝胶干物质含量之比为 1:2。在间歇搅拌下使吸附作用进行 40 分钟。离心后将已吸附上的蛋白质用最小体积的磷酸缓冲液(pH 7.6)洗脱下来,缓冲液的浓度每次递增 0.025 M(从 0.15 到 0.30M)。

硫酸铵反抽提*

在前一步所得的酶液中加入饱和硫酸铵溶液(pH 7.0~7.4),

* 这最后一步不是每次提纯酶时都进行的,只是在必要时才采用。

使样品中硫酸铵的浓度等于 28% (重量百分比)。5~10 分钟后, 将悬浮液在 10000 g 离心 10 分钟。将所得沉淀在玻璃匀浆器中与 1~2 毫升 26% 硫酸铵溶液 (用 0.05 M 磷酸缓冲液或用水配制) 研碎。将悬浮液离心 10 分钟(10000 g)。用同样的方法将沉淀再用 24%、22%、20%、18% 硫酸铵溶液进行抽提。向所得上清液加入饱和硫酸铵溶液至浓度为 28%。将样品离心 10 分钟(10000 g), 所得的沉淀溶解于 0.05 M 磷酸缓冲液(pH7.0)中, 对同样缓冲液进行透析。测定透析内液中的蛋白质含量及二胺氧化酶活力。

这一步所得的酶其比活力为每毫克蛋白质 1000 单位, 但是产率不高。

表 2 猪肾二胺氧化酶的提纯(实验例)

纯化阶段	组 分 的 鉴 定						
	体 积 (毫升)	总蛋白质 (毫克)	活 力		比活力 (单位/毫 克)	纯化程度	产 率 (%)
			(单位/ 毫升)	总活力 (单位)			
匀 浆	3200	235000	23.5	75500	0.32	1	100
硫酸沉淀(0.43 ~0.53饱和度)	176	7100	200.0	35200	4.96	15.5	46.7
DEAE-纤维素 吸附	435	1300	57.5	25000	18.5	58	33.2
第一次氢氧化 铝凝胶吸附	120	87	117.0	14050	170	532	18.6
第二次氢氧化 铝凝胶吸附	18	13	292.5	5260	400	1250	6.9

用二氯异三聚氰酸反应测定线粒体单胺氧化酶的活力

R. C. Кривченкова

方法的原理

线粒体单胺氧化酶, 胺:O₂-氧化还原酶(脱氨基酶), (黄素酶)

EC 1.4.3.4, 催化以下反应:



式中的 R 为脂肪族或芳香族基团。

单胺氧化酶活力的大小可以根据某些单胺类底物与线粒体制品一起保温时释放出的氨量来测定。为了测定试样中氨的含量, 采用了一个灵敏度很高的专一反应。这反应是根据氨在碱性条件下, 当有二氯异三聚氰酸盐、水杨酸盐及硝普盐(nitroprusside)存在时能形成在波长 660nm 下有最大吸收的绿色化合物的能力 (Reardon et al., 1966)。

用二氯异三聚氰酸盐试剂测定氨含量的方法, 其灵敏度比一般的用奈氏试剂反应的方法约高 100 倍。所以, 应用二氯异三聚氰酸盐反应来测定单胺氧化酶活力很适用于酶的活力较低或研究的材料很少时的测定。原则上, 此法可应用于任何有氨释放的酶促反应的研究。

试 剂

酪胺(对羟基苯乙胺)盐酸盐。

5-羟色胺己二酸盐或肌酸硫酸盐。

12% 水杨酸钠溶液(含有 0.06% 硝普钠)。

0.2% 异三聚氰酸钾的 1N KOH 溶液。

0.05 N 硫酸。

充分煮沸过的饱和碳酸钾溶液。

50% 三氯乙酸。

0.2M 磷酸钾钠缓冲液(pH 7.4)。

线粒体的分离及酶的制备已在前面叙述过 (B. З. Горкин и др., 1968)。

测定过程

每一试样中加入 100~400 微克线粒体蛋白质,如鼠肝线粒体(通常溶于 0.1~0.4 毫升缓冲液中)、底物(酪胺、5-羟色胺或其它单胺类)1 μM (通常溶于 0.2 毫升缓冲液中),加 0.1 M 磷酸钾钠缓冲液(pH 7.4)至最终体积为 1.8 毫升。将试样在氧气中在 37°C 的水浴中保温 60 分钟。在保温结束时加入 0.2 毫升 50% 三氯乙酸(最终浓度为 5%)以终止反应。离心(600 g, 3 分钟)分离出形成的沉淀。用 Conway 的等温蒸馏法,继之再用二氯异三聚氰酸反应测定上清液中的氨含量。为此,将 Conway 皿外槽的边上先抹上凡士林,再在外槽中加 0.7 毫升上清液,皿的中央放 1 毫升 0.5 N 硫酸。在外槽中加入 1.5 毫升碳酸钾饱和溶液以后立刻将皿盖上,在室温下放置 17~20 小时。外槽中被碳酸钾置换出来的氨被皿中央的硫酸所吸收。蒸馏完毕后,于皿中央加入 0.5 毫升水杨酸钠溶液,再加入 0.5 毫升二氯异三聚氰酸钾。30 分钟后,将皿中央的液体定量地转移到一个刻度试管中,然后加入重蒸馏水至总体积为 4 毫升。充分搅动后用分光光度计在波长 660 nm 下测定其光密度(比色杯光径为 1 厘米)。试验样品与对照(以缓冲液代替上清液)之间光密度之差即为该试样的氨含量。氨的含量可从标准曲线中算出。用每毫升含有 0.1 μM 氨的硫酸铵溶液制作标准曲线。

在生物学实验中,应用二氯异三聚氰酸盐反应的必须条件是氨的等温蒸馏。试样中有少量蛋白质及某些含氮化合物存在会干扰二氯异三聚氰酸盐反应“直接”法定氨(即在 Conway 皿中不经蒸馏而定氨)(Scely et al., 1967)。

为了防止平行试验中测定结果的明显偏差,所有的溶液都必须用重蒸馏的无氨的水配制,所有器皿都要用无氨的水涮一涮,必

须在空气中不含有微量氨的房间内进行测定。

在上述条件下进行试验时，当试样中加入 350 微克大鼠肝脏线粒体蛋白质及 $1\mu M$ 酪胺或 5-羟色胺时，释放出的氨量分别为 0.35 ± 0.02 及 $0.29\pm 0.01\mu M$ 。

用对-硝基苯乙胺作底物测定单胺氧化酶的活力

Г. Д. Исаханян, Ж. И. Акопян

方法的原理

对-硝基苯乙胺在单胺氧化酶 (EC 1.3.4.3) 催化下发生氧化脱氨基作用，对-硝基苯乙醛与过剩的底物相互作用而形成有颜色的产物，后者在强碱介质中可用正丁醇抽提出来。对完全透明的正丁醇相进行比色测定。

试 剂

50 mM 对-硝基苯乙胺盐酸盐：101 毫克溶于 10 毫升水中。

0.2 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)。

正丁醇。

0.5% 氢氧化钠。

pH 试纸。

测 定 过 程

磨口的试管中加入 1 毫升待测物，如线粒体悬浮液 (0.5~5 毫克蛋白质)、1 毫升 0.2 M 磷酸缓冲液 (pH 7.4)、0.1 毫升 50 mM 对-硝基苯乙胺溶液 ($5\mu M$ 底物)，加水至总体积为 3 毫升。仔细地搅动试样，并将它在 37°C 水浴中保温 45 分钟 (在此条件下对-硝基苯乙胺的脱氨基反应为零级反应)。保温终止后，在试样中立即加

入 0.5% NaOH 至 pH10.0 (用 pH 试纸控制) 使单胺氧化酶失活。然后, 试管中加入 4 毫升正丁醇, 塞上磨口塞, 剧烈振荡 1 分钟。将试管内的液体转移到聚乙烯离心管中, 4000 g 离心 5 分钟。将上层丁醇相小心地转移到分光光度计 (CФ-4) 比色杯 (光径 1 厘米) 中, 在波长 440 nm 下测其光密度值, 以空白试验的丁醇相作对照。空白试验中除无底物外其它一切条件都与上述试验相同。

单胺氧化酶的活力越高, 测得的光密度值也越高。图 2 中提供的为大鼠肝脏线粒体实验中所测得的光密度值与用其它方法 (按氨释放的速度) 所测得的单胺氧化酶活力的结果 (B. 3. Горкин и др., 1968) 的比较 (都用对-硝基苯乙胺作底物, 条件严格地相同)。所得直线可用作将正丁醇抽提液的光密度值换算为氨的

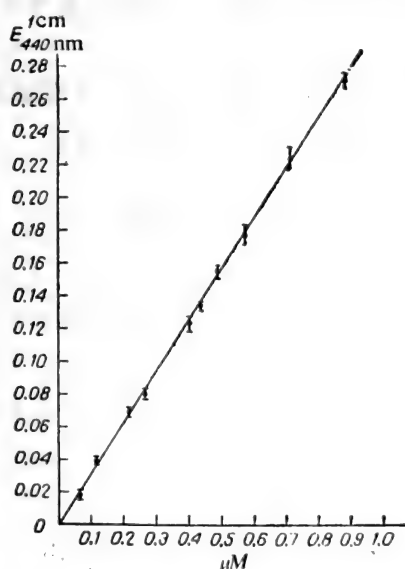


图 2 鼠肝线粒体引起的对-硝基苯乙胺脱氨基作用时释放出的氨量与平行试验中丁醇抽提液的光密度之间的关系

纵座标——440nm 的光密度; 横座标——试样中的氨量, 以微克分子表示

微克分子数的标准曲线。

动物组织线粒体单胺氧化酶的溶解及纯化

催化胺类物质氧化脱氨基作用的单胺氧化酶，在动物中主要集中于线粒体内，与线粒体膜碎片牢固地结合在一起。因此，要从膜的结构成分中分离出单胺氧化酶(溶解作用)并且进一步将这些酶加以提纯是十分困难的。在不同种类的动物中，以及在不同的器官中，单胺氧化酶在许多性质上有显著的不同。下面引述了根据不同的原理从四种不同的生物材料溶解与纯化单胺氧化酶的方法。

选择哪一种方法取决于研究的任务、有无合适的生物材料、仪器及试剂。所述方法中没有那一个方法是适用于任何情况的。

用无离子去污剂溶解和纯化公牛脑组织单胺氧化酶

Т. А. Москвитина

活力的测定

单胺氧化酶活力的测定是根据对-硝基苯乙胺脱氨基作用时形成的有色产物，而后的量可用光度法测定(В. З. Горкин и др., 1968)。

试剂 50 m M 对-硝基- β -苯乙胺，溶于 0.2 M 磷酸钾钠缓冲液(pH 7.4)中。

25% 无离子去污剂(OP-10)水溶液。

测定的过程 向 1 毫升缓冲液中加入 0.3 毫升 OP-10 溶液、0.1 毫升 50 m M 对-硝基- β -苯乙胺(底物)及等量的酶液，以使每个试样释放出的氨量不致超过 $0.4\mu M$ 。加水使试样的总体积到 3 毫升，37°C 保温 1 小时。保温后测定光密度(比色计为 ФЭК-57

H, 比色杯光径 10 毫米, 滤光片 No. 3)。光密度改变 0.125 相当于释出 $0.1 \mu M$ 氨。

在上述测定条件下, 1 分钟内催化形成 $1n M$ 氨的酶量定为酶的一个活力单位。按 Lowry 法测定蛋白质含量(Л. М. Гиндман, 1964)。制作标准曲线时采用含无离子去污剂 OP-10 的结晶牛血清清蛋白作标准。OP-10 的浓度与上述研究试样中所含的 OP-10 的浓度相同。无离子去污剂的量用溴百里酚蓝按标准曲线加以测定(Schwartz et al., 1958)。

酶的纯化

酶的溶解是用底物将酶的活性中心加以保护的情况下, 在强碱性介质中用去污剂完成的。用这种方法溶解的酶不必采用足以引起酶的专一性发生改变的方法而得到了纯化 (В. З. Горкин, 1972)。

试剂与材料

0.25 M 蔗糖溶液(pH 7.6)。

苜胺(碱)。

25% 去污剂(OP-10)溶液。

氢氧化铝凝胶 C_{α} 。

饱和硫酸铵溶液(用前加氨水将 pH 调到 7.6)。

1 M 磷酸氢二钾。

1 M 磷酸二氢钠。

0.01 M 及 0.004 M 磷酸钾钠缓冲液(pH 7.6)。

0.9% 氯化钾溶液。

牛脑来自屠宰场, 保存于冰中。所有操作除特别指出者外, 都在冷处进行。

线粒体的分离

将脑组织除去皮层、小脑及脑组织的膜以后,用 0.9% KCl 溶液洗涤。每次分离用 1.5 公斤脑组织。以每 100 克为一份与 500 毫升 0.25 M 蔗糖溶液一起在 Waring 匀浆器中进行匀浆。用 1 M K_2HPO_4 将所得的匀浆液调到 pH 7.6 (约需 7~15 毫升)。经四层纱布过滤后,与 13.5 升蔗糖液相混合。离心除去细胞核 (1500 g, 10 分钟)。弃去沉淀后,将上清液离心 20 分钟 (24000 g) 以沉淀线粒体。弃去上清。将沉淀分批在 Potter-Elvehjem 玻璃匀浆器中与 6250 毫升 0.25 M 蔗糖液进行匀浆,再离心 (条件同前)。将所得线粒体在玻璃匀浆器中与 1250 毫升重蒸馏水 (pH 6.0~7.0) 进行匀浆,离心 45 分钟 (40000 g),弃去上清液,将沉淀悬浮于 500 毫升重蒸馏水中,匀浆后于 -20°C 冰冻。在这样的状态下线粒体可保存二个月。

溶 解

将一部分线粒体融化,用水稀释,使达到每毫升悬浮液中含有 8 毫克蛋白质。在搅拌下按每 100 毫升悬浮液加入 0.125 毫升苄胺 (pH 11.2),放置 30 分钟后离心 30 分钟 (40000 g)。弃去上清液,将沉淀悬浮于重蒸馏水中使达到原来的体积。向所得悬浮液 (pH 10.7) 在冷处加入 25% OP-10 溶液,加入量按每 100 毫升悬浮液加 4 毫升 OP-10 溶液计算。30 分钟后,将悬浮液离心 30 分钟 (40000 g),弃去沉淀。上清液中加入 1 M Na_2HPO_4 至 pH 8.0,对 35 体积的 0.004 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6) 透析过夜。

在容器中用氢氧化铝凝胶 C_8 处理

所得的溶液在 pH 8.0 时带有强乳光,向此溶液中加入氢氧化

铝凝胶 C_8 。每次都需要通过试验来确定凝胶的用量,使在此条件下由于凝胶对杂蛋白的吸附而使酶达到最大限度的纯化。一般,在凝胶上能同时被吸附,但在离心后丢失的酶活力高达起始酶活力的 50%。在室温下并在间歇搅拌下进行 C_8 凝胶的处理。20 分钟后,离心 3 分钟(10000 g),弃去沉淀。

硫酸铵沉淀

向所得上清液在 pH 7.6 及有 0.4% OP-10 存在下加入硫酸铵饱和溶液,加入的量按每 100 毫升上清液中加 54 毫升硫酸铵饱和溶液计算。2 小时后,离心 10 分钟(30000 g)。收集沉淀,将它溶解于 0.01M 磷酸缓冲液(pH 7.6)中(磷酸缓冲液的量为上清液原始体积的 1/5),对 300 倍体积的 0.004 M 磷酸缓冲液(pH 7.6)透析 20 小时,其间更换缓冲液 5 次。

用 OP-10 去污剂处理

在已经除去微量铵离子的透析液中加入去污剂 OP-10 至最终浓度为 1%,1 小时后离心 30 分钟(40000g),弃去沉淀。上清液呈淡黄色并略带乳光。

再次用氢氧化铝凝胶 C_8 处理

将所得上清液再用氢氧化铝凝胶处理,方法如上所述。一般,用凝胶再次处理时只有 10% 左右的酶活力被吸附。

酶制剂的性质

得到的酶制剂含有的单胺氧化酶活力为起始匀浆液中该酶活力的 3~5%。用酪胺作底物时,酶的比活力为每毫克酶蛋白每分钟释放出 100 nM 氨。无离子去污剂的含量为 0.3~0.4%。含有

去污剂的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱中只显出一条蛋白质条带。这条带所含的蛋白质具有单胺氧化酶的活力。酶制剂能在3~4天内应用。由于在分离过程中酶极易被氧化，所以在工作之前必须用1mM二巯基苏糖醇保温1~3小时。

表 3 从牛脑线粒体纯化单胺氧化酶(实验例)

纯化阶段	组 分 鉴 定						
	体 积 (毫升)	活力(单 位/毫升)	总活力 (单位)	蛋白质浓 度(毫克/ 毫升)	比活力 (单位/毫 克)	产 率 (%)	纯化程度
匀 浆	4000	4.07	16300	6.0	0.68	100	1.0
线粒体的分离	200	43.5	8650	13.56	3.20	53	4.7
溶解作用	168	19.7	3310	3.97	4.95	20.1	7.1
用氢氧化铝凝 胶C _β 处理	196	12.0	2350	1.35	8.85	14.4	13.0
硫酸铵沉淀	64	34.8	2230	2.20	15.8	13.7	23.2
去污剂OP-10处理	43	29.1	1255	0.98	29.7	7.7	43.6
再次用氢氧化 铝凝胶C _β 处理	43	20.6	885	0.45	45.7	5.4	67.0

用无离子去污剂溶解与纯化公牛肝脏单胺氧化酶

Ж. И. АКОПЯН

在酶的纯化过程中单胺氧化酶的活力可根据对-硝基苯乙胺脱氨基的速度用比色法加以测定。一个酶的活力单位被规定为：在0.1M磷酸缓冲液中，37℃时一分钟内能催化释放1nM氮量的酶。

试 剂

苜胺(碱)。

50mM对-硝基苯乙胺盐酸盐：将101毫克溶于10毫升水中。

0.2M 磷酸钾缓冲液 (pH7.4)。

25% 无离子去污剂 Triton X-100 水溶液。

0.25M 蔗糖溶液。

硫酸铵(重结晶)。

5% 氨水。

氢氧化铝凝胶 C_8 。按下法制备：将 22 克硫酸铵溶于 500 毫升 63°C 的水中，加 100 毫升 10% 氨水。将此混合液立即加热到 50°C，在剧烈搅拌下一次加入 150 毫升预热到 58°C 的含有 76.7 克铝铵矾的水溶液。同时将温度升到 61°C，10 分钟后，立即离心从溶液中分离出沉淀，洗涤 5 次，每次用 1.5 升水搅拌后离心除去液体。在第 6 次离心后上清液仍然是混浊的，在室温中放两个星期后形成白色絮状沉淀，即为氢氧化铝凝胶 C_8 。

以冰冻状于 -20°C 保存的新鲜牛肝在 3~4 星期内仍可用于线粒体的分离。

酶的纯化

匀浆的制备

将冰冻状牛肝在室温中放 3~4 个小时使它完全融化后，与 10 倍体积的 0.25M 蔗糖溶液在 Waring 匀浆器中进行匀浆，用差速离心法分离线粒体，再用重蒸馏水洗涤沉淀。

溶 解

在每毫升含有 20 毫克蛋白质的线粒体的水悬浮液中 (pH 6.0~6.2)，在用磁力搅拌器不停的搅拌下(同时用 pH 计测定 pH 值)加入苄胺(碱)至最终浓度为 5mM。这时悬浮液的 pH 值上升至 8.2~8.3。加入 Triton X-100 (25% 水溶液) 至最终浓度为 0.75%。将悬浮液离心 40 分钟(10000 g)，弃去沉淀。上清液中含

有的酶活力为线粒体悬浮液中单胺氧化酶活力的75~95%。

硫酸铵分级分离

向所得上清液中在不断的搅拌与控制 pH 值的情况下加入结晶硫酸铵至 0.20 饱和度。加入 5% 氨水使 pH 保持在 8.2。在 -20°C 放 30 分钟, 4°C 放 90 分钟后离心 10 分钟(20000g), 弃去沉淀, 向上清液中加入硫酸铵至 0.4 饱和度, 于 -20°C 放 30 分钟, 4°C 放 90 分钟后, 于 20000 g 离心 10 分钟。将出现的沉淀悬浮于少量 0.1M 磷酸缓冲液(pH 7.4)中, 对 1mM 磷酸缓冲液(pH 7.4)透析至除尽铵离子为止。加入 Triton X-100 至终浓度为 0.75%, 在 25000 g 离心 10 分钟, 弃去沉淀。

氢氧化铝凝胶处理

向上清液部分加入氢氧化铝凝胶 C_β 悬浮液, 使上清部分蛋白质含量与凝胶干物质含量之比为 3:1。搅拌 40 分钟后, 于 10000g 离心 5 分钟, 弃去沉淀。

硫酸铵沉淀

向上清液部分加入硫酸铵至 0.40 饱和度, 并使 pH 值保持在 7.2~7.4 范围内。在 -20°C 放置 30 分钟, 4°C 放置 90 分钟后, 于 20000 g 离心 10 分钟。将出现的沉淀溶解于 10 mM 磷酸缓冲液(pH 7.4)中。将每毫升含有 1.0~1.5 毫克蛋白质的溶液对 1mM 磷酸缓冲液(pH 7.4)透析至除尽铵离子为止。将透析后的酶液离心 30 分钟(25000 g), 弃去沉淀。

再次用氢氧化铝凝胶 C_β 处理

向上清液中加入氢氧化铝凝胶 C_β , 加入之量按蛋白质与凝胶

之比为 1:1 计算。搅拌 40 分钟后,在 10000 g 离心 5 分钟,弃去沉淀。上清液部分即为纯化了的酶,所含单胺氧化酶的活力为起始匀浆中活力的 1% 左右(表 4)。纯化后的酶制剂中含 Triton X-100 的浓度为 0.5~1.0%。

酶制剂的性质

稳定性 酶在 4°C 72~96 小时内稳定,50°C 加热 5 分钟,50% 失活。

酶制剂的纯度 酶制剂在含有 Triton X-100 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上只见到一条蛋白质条带,这个组分具有单胺氧化

表 4 牛肝单胺氧化酶的纯化(实验例)

(Ж. И. Аюпян и др., 1972)

纯化步骤	组 分 鉴 定						
	体 积 (毫升)	活力(单 位/毫升)	总活力 (单位)	蛋白质含 量(毫克/ 毫升)	比活力 (单位/毫 克)	产 率 (%)	纯化程度
匀 浆	800	33.8	27040	26	1.3	100	1
线粒体的分离	75	130.2	9765	21	6.2	36	5.0
溶 解	68	116.8	7932	16	7.3	29	5.8
硫酸铵分级分离	45	89.7	4036	6.5	13.8	15	11.0
氢氧化铝凝胶 C ₂ 处理	48	54.7	2625	1.1	49.8	9.5	39.5
硫酸铵沉淀	8	39.8	318	0.4	99.6	1.2	79.0
再次用氢氧化铝 凝胶C ₂ 处理	6	38.3	229	0.12	319	0.9	253.5

酶的活力(以色胺作底物)。

分子量 用 Sephadex G-200 薄层层析测得的分子量为 264000。

米氏常数 用双倒数作图法测得的 K_m 值为 $3.2 \times 10^{-3} M$ (底物为色胺)。

最适 pH pH9.0 时色胺的脱氨作用速度最快。

用超声波与无离子去污剂联合溶解 和纯化大鼠肝脏单胺氧化酶

И. С. Северина

在酶的纯化过程中, 根据对-硝基- β -苯乙胺脱氨作用的速度用比色法测定单胺氧化酶的活力(Л. В. Брусова и др., 1965)。所用的试剂有: 50mM 对-硝基- β -苯乙胺, 0.2M 磷酸缓冲液(pH 7.4), 25% 无离子去污剂 Triton X-100。

测定的过程已在前面叙述过了(В. З. Горкин и др., 1968)。用波长 450nm 进行比色测定。

纯化酶的全部操作都在 4°C 进行。

线粒体的分离

用 0.25 M 蔗糖液将大鼠肝脏制成 10% 匀浆, 先除去细胞核及细胞碎片(В. З. Горкин и др., 1968), 再用 8500 g 冷冻离心 20 分钟分离出线粒体。用 0.01 M 磷酸钾缓冲液(pH7.4) 洗涤线粒体沉淀以除去一部分可溶性杂蛋白, 再用 8500g 离心 15 分钟。

线粒体膜的制备

将线粒体沉淀悬浮于蒸馏水中, 使蛋白质含量为每毫升 25~30 毫克, 并在 -20°C 保存。融化后用 0.0075M 磷酸钾缓冲液(pH 7.4) 将上述悬浮液稀释至每毫升含有 2.5~3.0 毫克蛋白质, 离心 20 分钟(25000 g), 将含有大量杂蛋白(多至线粒体蛋白质总量的

35%)的上清液弃去。沉淀即为线粒体膜。将此沉淀悬浮于 0.01 M 磷酸缓冲液(pH7.4)中(在 Potter-Elvehjem 玻璃匀浆器中匀浆悬浮),使蛋白质浓度为每毫升 10 毫克。制备线粒体膜这一步使得酶的比活力比原始线粒体悬浮液中的提高两倍(表 5, 第一步)。

溶解作用

向所得线粒体膜的悬浮液中加入盐酸苄胺至终浓度为 3 mM, 将此悬浮液用超声破碎机(Y3AH-1)在 8°C 35 千赫兹处理 6~10 分钟。超声处理后立即将悬浮液倒进一个预冷的研钵中,用玻璃砂仔细加以研磨,并逐滴加入 30% 无离子去污剂 Triton X-100 的水溶液至最终浓度为 1.5%。在室温中放置 1.5 小时后,将悬浮液在 4°C 160000g 离心 100 分钟。溶解后得到深棕色的酶液含有线粒体所具有的酶活力的 70%。溶解处理这一步对酶的纯化作用不大,比活力只提高 1.2 倍(见表 5, 第二步)。

氢氧化铝凝胶 C_r 上的负吸附

将溶解后的单胺氧化酶制剂从 0.05 M 磷酸缓冲液(pH 7.4)中吸附在氢氧化铝凝胶上。为此,将凝胶悬浮液(每毫升含 13 毫克干物质)加于溶解后的酶制剂中,使蛋白质与凝胶之比为 1:2。在这样的条件下,杂蛋白被吸附。在 4°C 搅拌 15 分钟后,将混合液在 8000 g 离心 5 分钟,弃去沉淀。上清液中(pH 7.4)单胺氧化酶的活力为溶解处理后的酶制剂活力的 70~80%。

硫酸铵沉淀

向所得上清液中分小批量地加入研磨得很碎的重结晶硫酸铵至 0.30 饱和度。用磁力搅拌器剧烈搅拌下在 0°C pH 7.3~7.7 下

进行沉淀作用,但是要尽可能防止起泡沫。逐滴加入5%氨水使pH维持在7.3~7.7。在3℃放置1小时后离心45分钟(30000g)分离出絮状沉淀,将它溶解于尽可能小量的5 mM磷酸缓冲液(pH 7.4)中,并对相同的缓冲液(含有 $1 \times 10^{-5}M$ 2-巯基乙醇)进行透析,将透析后所得的酶液上DEAE-纤维素柱进行纯化(见表5, 5~6步)。

DEAE-纤维素层析

将第一根柱(3×18厘米)用0.03 M磷酸缓冲液(pH 7.4)加以平衡*。将透析后的酶液的盐浓度及pH调到与上述磷酸缓冲液相同(即0.03M, pH 7.6),然后加Triton X-100至2.3%,将酶液上DEAE-纤维素柱。在此条件下杂蛋白被吸附。产率为原始酶活力的80%。

将比活力足够高的组分合并,对10升0.01M磷酸缓冲液(pH 7.46)透析过夜。将透析后的含有2% Triton X-100的酶液上第二根DEAE-纤维素柱(1.5×12厘米),事先用0.01M磷酸缓冲液(pH 7.46)将柱子进行平衡。用含有0.4% Triton X-100的0.05M磷酸缓冲液(pH 7.35)洗脱酶。

将具有最高比活力的几个组分合并。一般,这一步中所得的洗脱液的比活力高于线粒体悬浮液中的比活力约50倍。

如果这一步的酶制剂其纯化程度较低的话,则将0.05 M磷酸缓冲液(pH 7.35)的洗脱液合并后浓缩至Triton X-100的含量为1.2~1.5%,然后对0.01M磷酸缓冲液(pH 7.46)进行透析。将透析后的酶液重新上DEAE-纤维素柱,柱子事先用0.01M磷酸缓冲液(pH 7.46)加以平衡。酶的洗脱可以采用与上述相同的条件,

* DEAE-纤维素柱层析时所用的全部缓冲液都含有2-巯基乙醇,其浓度为 $1 \times 10^{-5}M$ 。

也可以采用 0.1M 磷酸缓冲液(含有 0.2% Triton X-100)。这一步可以使酶的纯度再提高 1.5~1.8 倍。

酶的产率为 9~10%，其比活力为线粒体中的 50 倍。单胺氧化酶制剂中含有 0.2~0.4% 的 Triton X-100。纯化单胺氧化酶的典型实验的结果列于表 5。

表 5 大鼠肝脏单胺氧化酶的纯化(实验例)

纯化阶段	组 分 鉴 定						
	总活力 (单位)	总蛋白质 (毫克)	活 力 (单位*/ 毫升)	蛋白质浓 度(毫克/ 毫升)	比活力 (单位/ 毫克)	纯化程度	产 率 (%)
线粒体悬浮液	9500	2100	13.3	3.0	4.4	1.0	100
1. 线粒体膜悬浮液	9790	1200	110	13.7	8	1.8	
2. 溶解作用	6700	637	71.6	6.5	11	2.2	70
3. 氢氧化铝凝胶 C ₂ 沉淀后的上清液	6437	309	66	3.15	21	4.7	67
4. 0.3饱和度硫酸 铵沉淀	5156	210	151	6.2	24.4	5.5	54
5. 第一次DEAE- 纤维素吸附	3350	55	101	1.65	61	14	35
6. 第二次DEAE- 纤维素吸附	900	4.1	70	0.32	220	50	9

* 一个酶活力单位规定为: 在 0.1 M 磷酸缓冲液(pH 7.4)中, 37°C 一分钟内能催化释放出 1 nM 的氨的酶量。

区 带 电 泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳时(5%凝胶, 0.1 M Tris-甘氨酸缓冲液, pH 9.3, 90 分钟)发现上述酶制剂中有四个蛋白质组分, 其中有一个组分停留于原点。以色胺作为底物测定时发现每个组分都具有单胺氧化酶的活力(Glenner et al., 1957)。

用丁酮溶解和纯化猪肝单胺氧化酶

И. С. Северина

用 Hollunger 及 Orelan(1970)的方法把与线粒体膜结合的酶释放出来。这一方法的基础是：在硫酸铵存在下用丁酮抽提线粒体中的磷脂两次，再用磷酸缓冲液提取酶。按照 Orelan (1971)的改良法将所得的可溶性制剂进行进一步的纯化。

活力测定

在纯化过程中，线粒体单胺氧化酶的活力用分光光度法测定，波长采用 250 nm，以苄胺为底物(Tabor et al., 1954)。

这个方法的基础是测定由苄胺形成苯醛的速度。

试剂 0.1M两次重结晶的盐酸苄胺溶液。0.2M磷酸缓冲液(pH 7.2)。

测定过程 见 В. З. Горкин 等(1968)。

一个酶活力单位规定为：在 24°C 一分钟内能引起波长 250 nm(光径 1 厘米)光密度的改变为 0.001 的酶量。试样体积为 3 毫升，含有 10 μ M 苄胺的 0.2 M 磷酸缓冲液(pH 7.2)。

酶的纯化

线粒体碎片的制备

取自屠宰场的猪肝，尽可能在屠宰后 1 小时内提取酶。取自同一头猪的 96 克肝(同时作三个平行试验)在冷处剪碎，在 0.25 M 蔗糖中用 Waring 匀浆器匀浆 2 分钟。将匀浆液的体积调到 960 毫升，在 10000 g 离心 5 分钟以除去细胞核及细胞碎片。将上清液经四层纱布过滤后，将体积用 0.25 M 蔗糖溶液调到 940 毫升，13000 g 离心 45 分钟以沉淀线粒体。将线粒体沉淀用 Potter-

Elvehjem 匀浆器将它悬浮于146毫升重蒸馏水中, 10000 g 离心15分钟。然后, 将线粒体沉淀重新悬浮于同样体积的重蒸馏水中, 再次离心(10000 g, 15 分钟)。将已裂解的线粒体悬浮于重蒸馏水中, 使蛋白质的浓度约为每毫升 50 毫克, 放于 $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 的冰库中 2 天。

单胺氧化酶的溶解

全部操作都在 $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 的冰库中进行。在大量应用丁酮时, 为了防止酶可能失活, 将 180 毫升已经裂解的线粒体悬浮液以每 60 毫升为一份进行溶解。在一个 1 升的烧杯中放 60 毫升裂解的线粒体悬浮液, 在磁力搅拌器剧烈搅拌下分批在 6 分钟内加入 8~10 体积丁酮(500 毫升), 待线粒体沉淀形成以后, 倾出上清液, 弃去。通压缩空气 6~10 分钟以除去丁酮蒸气。将线粒体沉淀悬浮于 200 毫升 $1\text{m MEDTA}-0.1\text{ M}$ 磷酸缓冲液($\text{pH } 7.2$)中, 用磁力搅拌器搅拌 5 分钟。30000 g 离心 10 分钟后, 弃去上清液(第一次缓冲液提取液)。将沉淀悬浮于 120 毫升 0.05 M 硫酸铵溶液中, 在充分搅拌下加入 11 体积丁酮, 抽提 6 分钟。当线粒体沉淀后, 倾出上清液, 再通压缩空气(10 分钟)以除去丁酮蒸气, 用 100 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液($\text{pH } 7.2$)抽提沉淀 10 分钟(操作同前)。30000 g 离心 10 分钟后得到第二次缓冲液的抽提液。此抽提液呈金黄色, 含有线粒体单胺氧化酶活力的 50~60%。溶解过程中使酶的纯度提高了 30~50 倍(表 5, 第一步)。

用 酸 沉 淀

在每毫升含有 0.7~1.0 毫克蛋白质的单胺氧化酶溶液中, 在冷处并充分搅拌下逐滴加入 1 M 乙酸溶液至 $\text{pH } 4.5$ 。立即将形成的沉淀(含有起始溶液中单胺氧化酶活力的 80%) 离心 (30000 g, 10 分钟)进行分离, 并将它溶解于最小体积的 $0.1\text{ M K}_2\text{HPO}_4-1\text{m}$

MEDTA 溶液中。将溶液的 pH 调至 7.5。

Sephadex G-200 凝胶过滤

把所得的深黄色溶液上 Sephadex G-200 柱(3×80 厘米)。柱子事先用 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.2)-1m MEDTA 溶液平衡。用同样的缓冲液洗脱酶, 流速为每小时 8 毫升左右。

用酸分级沉淀

所得洗脱液在搅拌下逐滴加入乙酸至 pH 5.75。30000 g 离心 10 分钟除去低活力的沉淀。上清液中再加入 1 M 乙酸至 pH 4.5, 立刻离心(30000 g, 10 分钟)收集形成的沉淀, 将它溶解于最少量的不含 EDTA 的 0.1MK₂HPO₄ 中。将溶液中和至 pH 7.5。

这一步所得的酶制剂的比活力几乎比匀浆中单胺氧化酶的比活力提高了 400 倍。酶的产率(按总活力计算)为线粒体中酶活力的 25%。纯化酶的一个典型实验的结果列于表 6。

表 6 猪肝单胺氧化酶的纯化(实验例)

纯化阶段	组 分 鉴 定						
	总活力 (单位)	总蛋白质 (毫克)	活 力 (单位/毫 升)	蛋白质浓 (毫克/毫 升)	比活力 (单位/毫 克)	纯化程度	产 率 (%)
线 粒 体	226000	7300	1200	41	29	1.8*	100
溶 解	114000	210	380	0.7	540	34	50
第一次酸沉淀 (pH4.5)	97500	37.7	15000	5.8	2620	162	43
SephadexG-200 凝胶过滤	83850	15.4	4300	0.8	5375	333	37
第二次酸沉淀 (pH4.5)	60000	9.6	20000	3.2	6250	396	26

* 线粒体的比活力几乎比肝匀浆的比活力高 2 倍。

酶制剂的纯度

酶制剂的纯度是根据每 1 克分子酶所含的黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 的克分子数来计算的。单胺氧化酶的分子量按 115000 计算(按 Oreland, 1971)。

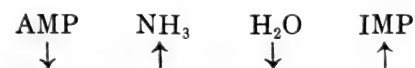
猪肝单胺氧化酶的纯制剂中 FAD 的含量, 可用分光光度法在 3 毫升含有 1.92 毫克蛋白质的酶液中, 按加入连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 前后, 波长 455 nm 光密度值之差来测定。FAD 的含量按公式 $D = \epsilon \cdot L \cdot C$ 计算。式中 D 为波长 455 nm 下消光值之差, ϵ 为 FAD 的克分子消光系数, L 为比色杯光径长度 (为 1 厘米), C 为 FAD 的克分子浓度。

比活力为 6200 单位的酶制剂, 每 123000 克蛋白质中含有 1M FAD。

测定腺苷酸脱氨酶活力的电位滴定法

В. А. Пеккель, Ж. И. Аюпян

腺苷酸脱氨酶(5'-AMP-氨基水解酶, EC 3.5.4.6)按下图催化腺苷酸脱氨:



方法的原理

电位法测定腺苷酸脱氨酶活力的根据是间接地测量氨的量。由于酶促反应而释放出来的氨在 $\text{pH} \leq (\text{pK}_{\text{NH}_4^+} - 1) \leq 8.13$ 时全部解离, 即所带的质子为 1:1。测定反应液中质子浓度的降低 (ΔpH), 就可以确定所形成的氨量。 ΔpH 和氨量之间的比例由介

质的缓冲容量决定。腺苷酸脱氢酶的比活力可按下列公式计算:

$$\text{比活力} = \frac{\Delta \text{pH}}{t \times E} \times \beta$$

式中 ΔpH 为反应过程中 pH 的改变, t 为反应的时间(分钟), E 为蛋白质质量(毫克), β 为整个反应液的缓冲容量。

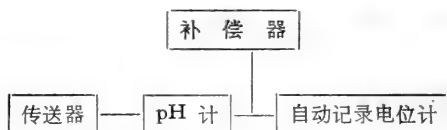
试剂及材料

AMP- Na_2 。

0.45M KCl 溶液。

牛血清清蛋白。

酶反应中记录 pH 改变的装置的方块图如下:



任何一对用于测量 pH 的电极都可用作传送器, 如玻璃电极 (ЭСЛ-43-07) 及氯化银电极 (ЭВМ-1М3)。苏制 pH 计中以 pH 626 型实验室用 pH 计最为合适。补偿器用来改变自记电位计 КСП-4 的灵敏度及测量范围 (КСП-4 本身的测量范围为 0~20 mV)。

缓冲容量的测定

理论上缓冲容量 (β) 可在任何一个 pH 刻度上加以测定, 其值为:

$$\beta = \frac{dx}{d\text{pH}}$$

式中 dx 为加入碱的量, $d\text{pH}$ 为 pH 的相应改变。但是, 可以假定在一狭窄的 pH 范围内酶、底物及氯化钾溶液(本底)的缓冲容量

是恒定的，所以可测定某一 pH 工作范围的 β 值。用微调螺旋或同步马达 ДСД-2 从结核杆菌素注射器注入 5mM KOH 溶液来滴定 β 值。测定整个反应介质的 β 值是不可能的，因为在介质中随着 pH 的改变而发生反应。因此，要对介质中的各个成分分别进行滴定，混合液的缓冲容量则按下式计算：

$$\beta = \beta_P + \beta_E + \beta_S$$

式中 β_P 、 β_E 及 β_S 分别代表本底、酶及底物的缓冲容量。

测定 β_E 值时，可以用牛血清清蛋白来代替腺苷酸脱氢酶，因为牛血清清蛋白的等电点 pH4.95 与腺苷酸脱氢酶的等电点 pH 5.6 十分接近。在 AMP 为每毫升 50~2000 μM 和牛血清清蛋白为每毫升 50~400 微克的浓度范围内， β 值随浓度的增加而直线上升。这样就可以找到反应液中每一成分的“比缓冲容量”(β')，并可按下式计算 β 值：

$$\beta = \beta_P + \beta'_E \times E + \beta'_S \times S$$

式中 E 及 S 为加入试样中的酶量及底物量。

在 pH 6.60~7.00 范围内，我们测得 $\beta'_{AMP} = 0.386 \mu M/pH$ ， μM AMP， $\beta'_{牛血清清蛋白} = 0.098 \mu M/pH$ ，毫克牛血清清蛋白。如果反应是在 6 毫升 0.45 M KCl 中进行（这个 KCl 浓度对防止酶的解离是必需的），则 $\beta_P = 0.356 \mu M/pH$ 。

实验例子：准备下列各保温混合液的成分：

- 1) 60 mM AMP，溶于 0.45 M KCl 中 (pH 6.6)。
- 2) 0.45 M KCl 溶液。
- 3) 大鼠肝脏线粒体，悬浮于 0.45 M KCl 中（蛋白质含量为每毫升 23 毫克）。

在体积为 20 毫升的比色杯中加入 2 毫升线粒体悬浮液、3.9 毫升 0.45 M KCl、0.1 毫升 60 mM AMP。立即将它们混合，并开始测定与记录 pH 值。测定介质 pH 的改变、反应的时间及反应混合液的缓冲容量，即可计算

出反应的速度及酶的比活力。图 3 中列出了大鼠肝脏线粒体使 AMP 脱氨的反应记录。根据反应开始后 15 分钟的曲线计算出来的腺苷酸脱氨酶的比活力为每分钟每毫克蛋白质 1.8 nM NH_3 。在同一试样中用 Conway 法定氨所测得的酶活力为每分钟每毫克蛋白质 1.6 nM NH_3 。将电位滴定法的结果与分光光度法的结果(Kalkar, 1947)相比较时发现两者完全相符。

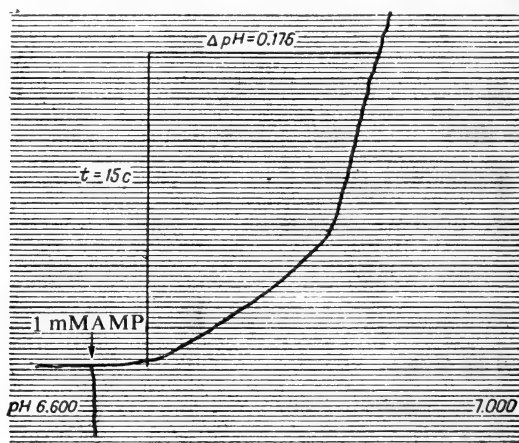


图 3 由大鼠肝脏线粒体催化的 AMP 脱氨反应记录。保温液为: $6 \mu\text{M AMP}$, 大鼠肝脏线粒体(46 毫克蛋白质), 悬浮于 6 毫升 0.45 M KCl 中。反应在室温(23°C)中进行。线粒体按 Schneider 的方法(1948)制备, 蛋白质按 Lowry 法(1951)测定

大鼠骨骼肌腺苷酸脱氨酶的纯化

Ж. И. Аюпян, А. З. Киркель

在此纯化法中利用了腺苷酸脱氨酶在磷酸纤维素上被选择性吸附的特性。下述简易法可制备高纯度的酶制剂(Smiley et al., 1967)。

酶活力的测定

腺苷酸脱氨酶(EC 3.5.4.6)活力的测定系根据下列反应:



用分光光度法在波长285nm下测量光密度的上升(Kalkar, 1947)。在此波长下 AMP 的克分子消光系数为 480, IMP 为 730。所以当光密度升高 0.250 时($\Delta D = 0.730 - 0.480 = 0.250$) 每 1 升中就有 1mM AMP 被转变成 1mM IMP (或者 1 毫升中有 $1\mu\text{M}$ AMP 转变成 $1\mu\text{M}$ IMP)。

反应在体积为 3 毫升的试样中进行(比色杯光径为 10 毫米)。因此, 如果在试样中形成 1 mM IMP, 则在波长 285 nm 下光密度的增加应为 $0.083(0.250:3)$ 。

一个酶活力单位(U)规定为: 在 0.05M 咪唑-HCl 缓冲液(pH 6.5)中, 室温, 1 分钟内能催化形成 $1\mu\text{M}$ IMP 的酶量为一个活力单位。

试剂和材料

AMP- Na_2 。

抽提用缓冲液: 0.18 M KCl, 0.054 M KH_2PO_4 , 0.035 M K_2HPO_4 (pH 6.5)。

0.45M 及 1M KCl 溶液(pH 7.0)。

磷酸纤维素 P-11(Whatman, 英国)。

为了使磷酸纤维素的吸附性明显增加, 在使用前对它作了额外的处理(Peterson, 1970)。

在搅拌下向 50 克纤维素加入 75 克氢氧化钠的水溶液(185 毫升水)。将形成的粘稠物质在冰浴中放置 30 分钟, 然后仍在冰浴中边搅拌边慢慢地加入 330 毫升水。经 15 分钟后, 大约在 50 分钟内, 逐滴加入 80 毫升磷酰氯(POCl_3)的乙醚溶液, 同时应使悬浮液的温度保持在 $25\sim 30^\circ\text{C}$ 。最后的 pH 值应为 6.0 左右。几分钟以后, 在一个大结晶皿中用水将悬浮液稀释到 2 升, 放置过夜。

通过反复倾析将沉淀洗涤至上清液完全澄清为止。将沉淀滤出后用 96% 乙醇洗涤、干燥。产品为白色粉末, 重约 30 克, 含磷 1.9%, 即每克含磷 0.6 mM。

采用雄性大鼠的骨骼肌。

酶的纯化

匀浆的制备

用 Waring 匀浆器在 330 毫升提取用的缓冲液中将 100 克新鲜肌肉组织进行匀浆。匀浆在室温中进行, 先用每分钟 8000 转的速度匀浆 5 分钟, 再用每分钟 4000 转速度匀浆 25 分钟。14000 g 冷冻离心 30 分钟, 弃去沉淀, 将上清液经三层纱布过滤。

上清液的处理

在所得的上清液中加入磷酸纤维素 1.25 克(干物质), 用磁力搅拌器慢慢搅拌 30 分钟, 这时, 约 90% 腺苷酸脱氨酶活力被吸附在磷酸纤维素上。静置澄清后, 倾去上清液, 将磷酸纤维素转移到一个有玻璃滤器(No. 2~3)的漏斗上, 用 330 毫升(80~100 毫升为一份)抽提用缓冲液洗涤, 以除去一部分杂蛋白, 洗涤时用水泵轻轻抽一下。然后, 就在这个漏斗上用 330 毫升 0.45 M KCl(pH 7.0)—1 mM 2-巯基乙醇(80~100 毫升为一份)洗涤磷酸纤维素。将纤维素重新悬浮于 0.45 M KCl(pH 7.0)中, 再上磷酸纤维素柱(2.5×25 厘米)。用 1 M KCl—1 mM 2-巯基乙醇将吸附在磷酸纤维素上的腺苷酸脱氨酶洗脱下来。只出现一个酶组分, 它在洗脱图中呈一对称尖峰。在这个组分中集中了酶总活力的 30% 左右, 比起始上清液组分中的酶活力提高了 250~300 倍(表 7)。也可在漏斗中用 1 M KCl 洗脱酶, 但这时酶的产率明显降低(减低至 3~5%)。

表 7 大鼠骨骼肌腺苷酸脱氢酶的纯化(实验例)

纯化阶段	组 分 鉴 定						
	体 积 (毫升)	活 力 (单位/毫 升)	总活力 (单位)	蛋白含量 (毫克/毫 升)	比活力 (单位/毫 克)	纯化程度	产 率 (%)
匀浆上清液	270	14.2	3827	13.5	1.05	1	100
磷酸纤维素吸 附后洗脱	2.75	432	1188	1.5	288	274	31

酶 的 性 质

稳定性 在 1 M KCl—1 mM 2-巯基乙醇中酶在 20~25 天内稳定。

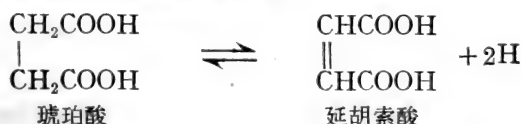
米氏常数 用双倒数作图法测得的 K_m 值为 1 mM (底物为 AMP)。

最适 pH 在 pH 6.5 时腺苷酸脱氢反应的速度最大。

线粒体悬浮液中琥珀酸脱氢酶活力的测定

P. C. Кривченко

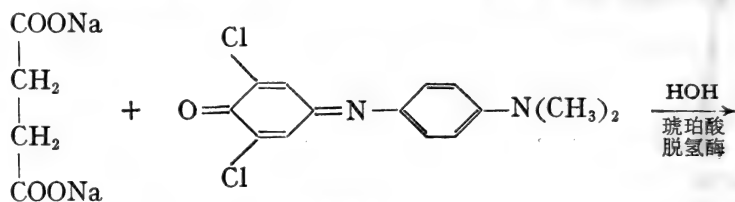
琥珀酸脱氢酶, 琥珀酸:(受体)-氧化还原酶, EC 1.3.99.1。按下列反应式催化三羧酸循环中的一个反应:



方法的原理

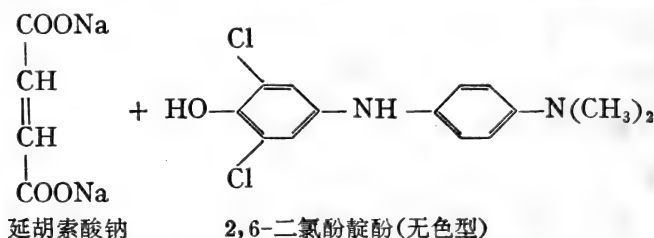
琥珀酸脱氢酶活力的测定是根据琥珀酸钠被酶促氧化时, 在有硫酸 N-甲基二氮蒽 (Phenazine methosulfate) 存在的情况下

2,6-二氯酚靛酚被还原时,对波长 600 nm 光密度的降低的测量。



琥珀酸钠

2,6-二氯酚靛酚



延胡索酸钠

2,6-二氯酚靛酚(无色型)

试 剂

0.5M 琥珀酸钠溶液。

0.1 M 磷酸钾钠缓冲液(pH7.4)。

0.02M 硫酸 N-甲基二氮蒽。

0.001M 2,6-二氯酚靛酚溶液。

0.05M 氰化钾。

后面三个溶液在实验当天配制使用。

操 作 过 程

试管(最终体积 4 毫升)中加入 0.3 毫升*缓冲液,再顺次加入 0.2 毫升琥珀酸钠溶液, 0.2 毫升硫酸 N-甲基二氮蒽, 0.2 毫升氰化钾及 0.2 毫升 2,6-二氯酚靛酚。最后一个试剂在测定酶的活力 10 分钟之前加入。不应预先将琥珀酸钠、硫酸N-甲基二氮蒽

* 原文如此。应改为3.0 ml——译者。

及 2,6-二氯酚靛酚彼此混合, 因为这样可能使 2,6-二氯酚靛酚发生非酶促还原。将试管内的反应液混匀后, 于 37°C 水浴中保温 2~3 分钟。然后试管中加入线粒体悬浮液(0.1~0.2 毫升缓冲液中含 0.1~0.2 毫克蛋白质)。立即将试管内的反应液倒入比色杯(光径 1 厘米), 用秒表记下反应开始的时间。将比色杯装入恒温比色杯支架中, 在 37°C , 波长 600nm 每隔 15 秒钟测定一次光密度, 共测定 2 分钟。以同样的方式测量不含琥珀酸钠的试样的光密度降低(内源酶活力)。在计算琥珀酸脱氢酶的实际活力时, 应将内源酶的活力从含有琥珀酸的试样中所表现出来的琥珀酸脱氢酶活力中减去。测量光密度时的对照比色杯中只含缓冲液。应尽可能快(2~3 分钟内)地测量线粒体悬浮液中的琥珀酸脱氢酶活力。

用 1 分钟内 1 毫克蛋白质在酶反应的过程中使光密度降低的值来计算琥珀酸脱氢酶的活力。按光密度降低 1.0 等于有 60 nM 2,6-二氯酚靛酚被还原 (Cooper, 1967), 而被还原的染料的数量与被氧化的琥珀酸盐之量成正比, 所以可以用被氧化的琥珀酸的 nM 数来表示琥珀酸脱氢酶的活力。

测定大鼠肝脏线粒体悬浮液中的琥珀酸脱氢酶活力。将线粒体悬浮液冰冻又融化, 接着用低渗缓冲液 (0.01M 磷酸钾钠缓冲液, pH 7.4) 洗涤以除去一部分杂蛋白。在这样的悬浮液中琥珀酸脱氢酶的活力为 1 分钟内 1 毫克酶蛋白氧化 82.1 ± 3.5 nM 琥珀酸盐 (B. З. Горкин, Р. С. Кривченкова, 1971)。

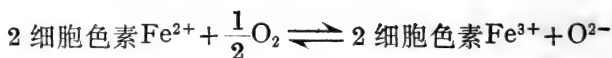
线粒体悬浮液中细胞色素氧化酶活力的测定

Р. С. Кривченкова

方法的原理

细胞色素氧化酶 (细胞色素 c: 氧-氧化还原酶, EC 1.9.3.1)

催化下列反应:



在线粒体悬浮液与细胞色素 c 及二甲基对-苯二胺一起保温时, 由于二甲基对-苯二胺氧化的结果而形成在波长 510 nm 处有最大吸收的红色色素, 其量与线粒体细胞色素氧化酶的活力成正比 (Straus, 1956)。用无水乙醇与四氯代乙烯的混合液 (3:1) 提取形成的色素。用过量的二甲基对-苯二胺保持在酶促反应过程中细胞色素 c 的氧化状态。

试 剂

0.04% 细胞色素 c 溶液。

0.4% 二甲基对-苯二胺盐酸盐。

无水乙醇。

四氯代乙烯。

细胞色素 c 及二甲基对-苯二胺这两个试剂应在实验时当天配制, 并将它们保持在冰浴中。无水乙醇与四氯代乙烯按 3:1 混合。

操 作 过 程

每个试管中各加入线粒体悬浮液 0.2~0.3 毫升 (如鼠肝线粒体)。线粒体的蛋白质含量为 0.4~0.5 毫克, 悬浮于 0.01 M 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中。加入 0.04% 细胞色素 c 水溶液 0.2 毫升, 重蒸馏水 1 毫升。将试样在 37°C 预热 2 分钟后加入 0.1 毫升 0.4% 二甲基对-苯二胺溶液。用秒表记下反应开始的时间。将试样保温 1~3 分钟, 至出现红色时为止。保温后, 将试样在冰浴中冷却, 用 4 倍体积的无水乙醇和四氯代乙烯的混液 (3:1) 抽提出所形成的有色物质。应用这种溶剂在弱酸性介质中 (pH 5.6~6.0) 可将

色素全部提取出来。在试样中加入二甲基对-苯二胺盐酸盐后可达到这个 pH 值。在加入抽提混合液以前必须检查试样的 pH 值,并在必要时用稀盐酸将它调到 pH 5.6~6.0。

离心分离出沉淀。用巴氏移液管小心地将澄清的上清液转移到一个干燥的试管中,用 CФ-4 型分光光度计在波长 510nm 光径为 10 毫米的比色杯中进行测量,以抽提用混合液作为空白。颜色在 10 分钟内是稳定的。

对照组试样的制作方法与上述方法相同,但在细胞色素 c 加入线粒体后,即在试管中加入 1 毫升无水乙醇以终止反应。

为了用被氧化的二甲基对-苯二胺的 nM 数来比示细胞色素氧化酶的活力,用重铬酸钾制作一条标准曲线。二甲基对-苯二胺在有重铬酸钾存在时被非酶氧化而生成红色色素。准备好几组试管,每个试管中加入 0.02% 重铬酸钾溶液(每一组试管中加入的量为 0.1~0.9 毫升),再加入磷酸钾钠缓冲液 1 毫升及 0.01% 二甲基对-苯二胺溶液,用水将体积补足到 4 毫升。第一组试管中各加入 0.15 毫升 0.01% 二甲基对-苯二胺,第二组试管中各加入 0.2 毫升,第三组试管中各加入 0.25 毫升,第四组试管中各加入 0.30 毫升 0.01% 二甲基对-苯二胺。用 4 毫升无水乙醇与四氯代乙烯混合液抽提试样,3~5 分钟后,在波长 510nm 下测定试样的光密度,用所得的光密度值绘制标准曲线(图 4)。根据我们的数据,光密度 0.120 相当于 4 毫升试样中有 174 nM 被氧化的二甲基对-苯二胺。

在建立方法学时要重新制作标准曲线,因为实验的结果与所用试剂及仪器有关。使用图 4 中的方法时,只能视为一个制作计算曲线的例子而已。

在经过冰冻又融化的大鼠肝脏线粒体悬浮液的试样中,氧化了的二甲基对-苯二胺的量为每分钟每毫克蛋白质 $415.5 \pm 34 nM$ 。

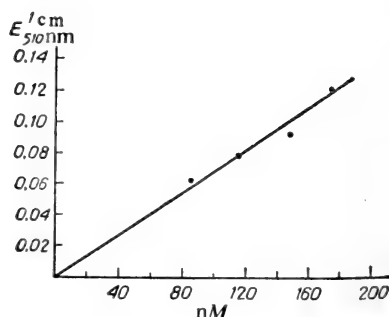


图 4 计算被氧化的二甲基对-苯二胺量的标准曲线

纵座标——波长 510 nm 的光密度；横座标——4 毫升试样中被氧化的二甲基对-苯二胺的 nM 数

肝脏微粒体组分的分离及其氧化系统的特性

И. И. Карузина, А. И. Арчаков

微粒体组分的制备

只有在应用差速离心法将细胞质网膜*(内质网膜)以微粒体组分的形式分离成功后,对细胞质网膜的详尽研究才成了可能。最早应用这一方法的研究工作是在 1948 年由 Claude 完成的,他将细胞质网膜以“微粒”组分的形式分离出来。以后进一步证明了:沉淀得比较慢的亚细胞微粒(微粒体)组分中含有全部细胞质网膜的组分。这些亚细胞结构的膜在原地(in situ)上的明显分化在分离后的组分中仍被很好地保存下来(Dallner, Ernster, 1968)。

为了制备肝细胞质网膜,将组织匀浆先在 10000~12000 g 离心 15~20 分钟。这时,未破碎的细胞、细胞核、线粒体、大部分溶酶体及过氧(化)物酶体、细胞质膜的大囊泡(пузырька)等都被沉

* 细胞结构的命名采用国际组织学命名法。

淀掉。将上清液进一步在 78000~100000 g 离心 60~120 分钟,使细胞质网膜沉淀,这样所得的微粒体组分是非常不均一的,它的成分因生物组织的类型而异。例如,对于肝脏来说,其特点是有非颗粒状的(光滑的)及颗粒状的(粗糙的)膜,游离的多聚核糖体及核糖体等亚组分。用同样的条件从胰腺分离出来的微粒体组分中,除了上述成分外,还含有片状复合体膜(高尔基体)。从肾脏及腹水癌细胞所得的组分,其特点是具有外质膜,而脑组织微粒体的组分有髓磷脂(myelin)碎片、质膜及突触体(Synaptosome)(Dallner, Ernster, 1968; Tata, 1969)。

所以“微粒体”或“微粒体组分”一词通常用来表示不同组织的匀浆中沉降得最慢的颗粒,而与这些颗粒的形状无关。

到现在为止还没有从不同的器官和组织中分离微粒体组分的标准方法。此外,甚至从同一个组织中分离微粒体时,也应当时刻注意到所分离的组分的目的。例如,如果要研究的是细胞质网膜的还原链,那么就要注意由线粒体引起的污染的可能性。如果是要研究蛋白质生物合成,那么就要尽量设法防止多核糖体复合体与膜之间的结合受到破坏。

分 离 步 骤

将雄性大白鼠(体重 200~250 克)断头杀死,剖开腹腔及胸腔,经心脏将套管插入下腔静脉内,将肝脏用 1.15% 冷 KCl 溶液或用 0.25M 冷蔗糖溶液(pH7.4)洗至淡黄色。应用 KCl 可以制备到杂蛋白含量最低的微粒体组分。如果微粒体制剂还要进行进一步分级分离时,最好采用蔗糖溶液。取出肝脏放在纱布上吸干,称重后剪碎。全部操作在 0~4°C 中进行。

用带聚四氟乙烯研杵的 Daunce 匀浆器制备匀浆。组织的重量与溶液的体积之比为 1:3 (用 KCl 时) 或 1:9 (用蔗糖溶液时)。

匀浆持续 1 分钟, 研杵上下移动 20~30 次。然后将匀浆转移到 10 毫升的离心管中, 0°C, 900 g 离心 15 分钟 (用 KCl 时) 或 10000g, 20 分钟 (用蔗糖溶液时)。不含细胞核及线粒体的上清液 (除去线粒体后的上清液) 作进一步离心以沉淀细胞质网膜。如果采用大体积离心管 (25 或 50 毫升, MSE, High-Speed-18, 转头 69181), 那么离心的条件就变为: 在盐介质中, 细胞核及线粒体在 9500g 离心 20 分钟即沉淀, 在蔗糖介质中则需 12500g, 离心 30 分钟才能使它沉淀。

将所得的除去线粒体后的液体在 BAK-60 型超离心机 (转头 684, 8.35 毫升) 或 BAK-601 型离心机 (转头 2329, 8.35 毫升) 或日立 65P 离心机 (转头 RP30 553, 12.35 毫升) 离心 60 分钟 (105000 g) (KCl 中) 或 90 分钟 (蔗糖中)。将细胞质网膜悬浮于合适的介质中, 使每克鲜重鼠肝与 1 毫升介质混合后得到的微粒体组分悬浮液中每毫升约含有蛋白质 10 毫克。

纯度的测定

为了定量地评价亚细胞结构分离方法的效率可以应用 A. И. Арчаков 等 (1973) 所提供的方法。此法的要点如下: 测定原始匀浆液中及最后所得的制剂中细胞质网膜指示酶的活力 (把酶的活力换算成匀浆或组分中蛋白质总量的酶活力), 就可容易地计算出微粒体组分占匀浆中所含微粒体的百分率 (产率)。测定匀浆中及分离后的微粒体制剂中细胞质网膜 (被分离出的结构) 及能污染制剂的结构 (线粒体、溶酶体、过氧 (化) 物酶体) 中指示酶的活力, 即可计算出组分的纯度:

$$b = \frac{K_e \times 100}{K_m} \%$$

式中 K_m 为组分的最大可能的纯化程度 (100%), 它是根据匀浆的

各个组分中蛋白质的百分含量计算而来的, 肝脏中的组分为: 线粒体为 5(20% 蛋白质), 微粒体为 5(20% 蛋白质), 溶酶体为 50(2% 蛋白质), 过氧化物酶体为 40(2.5% 蛋白质)。 K_e 为实验值, 它代表原始匀浆及所得制剂中可被分离出来的及所引起污染的细胞器结构中两者比活力之比。 b 为分离后的制剂中被分离的细胞器结构与引起污染的细胞器结构中蛋白质的含量(%)。按照这种算法, 用上述方法制备的微粒体制剂中含有: 88~90% 细胞质网蛋白质, 1.5% 左右的线粒体蛋白质及 10% 尚未鉴定的蛋白质。组分的得率为匀浆中细胞质网总量的 25%。

微粒体组分的氧化酶系统

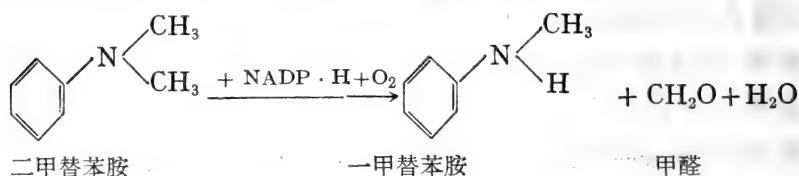
必须把在细胞质网膜中所进行的氧化过程中的两类反应区别开来。这两类反应是: 化学性质上不同的一些物质的羟基化反应及不饱和脂肪酸的过氧化作用。测定细胞质网膜中脂类物质的过氧化作用速度的方法在 Ю. А. Владимир 和 А. И. Арчаков 的专著(1972)中已有详细的叙述。因此, 下面只列举测定羟化酶活力及测定与此反应相偶联的由微粒体还原系统引起的 $NAD \cdot H$ 和 $NADP \cdot H$ 的氧化作用的方法。可以借助于加入的电子受体测定还原链上各个酶的活力, 电子受体的还原电位使得它能与一定的载体相互作用。还原链中电子传递的总速度可按 $NAD \cdot H$ 及 $NADP \cdot H$ 的氧化速度或按氧的吸收速度来测定。此外, 现代的光学技术可直接测定从黄素蛋白到细胞色素 b_5 或 p_{450} 这一段的电子传递速度及这些血红蛋白在组分中的含量。

测定羟化酶活力的方法

N -脱甲基酶的活力

二甲替苯胺脱甲基的速度可以作为微粒体羟化酶活力的一个

指标，而脱甲基的速度可按形成甲醛的量来测定。这一反应在 NADP·H 及氧的参与下在细胞色素 P₄₅₀ 分子上进行。



测定的过程 1 毫升反应液中含有：40 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6)，16 mM MgCl₂，3 mM NADP·H 及 ~1.5 毫克微粒体蛋白。

加入二甲替苯胺至浓度为 6 mM 而使反应开始进行 (用 0.05 N HCl 配制 60 mM 的二甲替苯胺原液)。将实验及对照试样 (不含 NADP·H) 在剧烈搅拌下于 37°C 保温 20 分钟。加入等体积的 25% ZnSO₄ 和饱和 Ba(OH)₂ 溶液的混合液 0.25 毫升以终止反应。将试样于 3500g 离心 10 分钟以沉淀蛋白质。用奈氏颜色反应 (Nash, 1953) 测定上清液中甲醛的含量。向 0.5 毫升上清液加入 2 毫升 Nash 试剂 (其成分为：2 M 乙酸铵、0.05 M 冰乙酸、0.02 M 乙酰丙酮)。将试样在 37°C 水浴中放置 45 分钟以显色。用 CΦ-4A 型分光光度计在波长 412 nm 下测定所生成的颜色的强度。

我们实验室中建立了测定甲醛含量的微量法：将 250 微升上清液加入微量试管中，再加入 120 微升 Nash 试剂，其浓度比文献中的高 4 倍。将试样于 37°C 保温 45 分钟，用微量比色杯在 CΦ-4A 型分光光度计在波长 412 nm 下测量光密度。

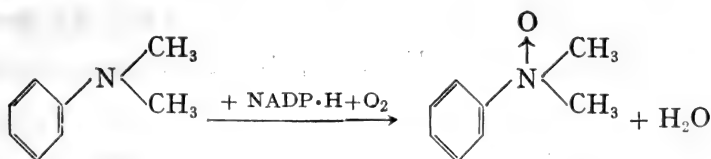
用甲醛标准液制作标准曲线，按标准曲线计算酶的活力。二甲替苯胺脱甲基作用的最大速度为每 1 分钟每 1 毫克酶蛋白 7~9 nM。

测定 N-脱甲基酶活力时可用异柠檬酸盐的及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 NADP·H 发生系统来代替 NADP·H。异柠檬酸脱氢酶 NADP·H 发生系统的成分为：10 mM 异柠檬酸钠、8 mM

MgCl₂, 40 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)、异柠檬酸脱氢酶(每毫升1个酶单位)及 0.6 mM NADP⁺。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶NADP·H 发生系统的成分为: 10 mM 葡萄糖-6-磷酸钠、16 mM MgCl₂、10 mM 尼克酰胺、40 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 0.5 单位/毫升(英国«Koch-Light 公司»)或 1 单位/毫升(瑞士«Fluka»)、0.6 mM NADP⁺。对照组中在反应终止后加入 NADP⁺。用上述两个系统工作时试样中蛋白质的最终含量为 1.5~2.0 毫克。除了二甲替苯胺可作为 *N*-脱甲基作用的底物外, 也可用氨基比林(Аминопирин)或乙基吗啡(Этилморфин)作为底物, 其最终浓度分别为 8 mM 及 1 mM。氨基比林脱甲基反应的最大速度为每 1 分钟每 1 毫克蛋白质 4~6 nM。乙基吗啡为每 1 分钟每 1 毫克蛋白质 10~12 nM。

N-加氧酶活力

以二甲替苯胺作为这个反应的底物。这个反应由含 FAD 的黄素蛋白(氨基酸氧化酶)催化, 有 NADP·H 及氧存在时发生下列反应:



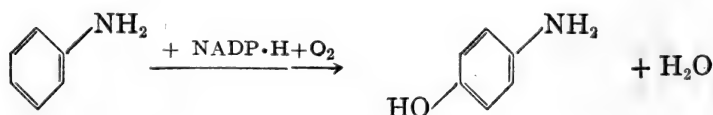
根据 *N*-氧二甲替苯胺生成的量来测定 *N*-加氧酶的活力。*N*-氧二甲替苯胺在 pH 2.5 时易被还原成二甲替苯胺, 后者遇 NaNO₂ 就转变成对-苯替甲亚硝铵, 它是一个有色化合物, 在波长 420 nm 有最大吸收。

测定的过程 保温液中各成分的含量及在反应终止以前的测定过程均与测定脱甲基酶活力时相同。加入 0.5 毫升 0.9 N HClO₄,

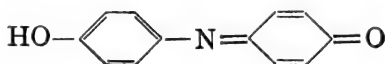
以终止反应。离心 10 分钟沉淀蛋白质(3500 g)。在磨口带塞刻度试管中加入 1 毫升上清液。在一个试样中加入 0.33 毫升 1 *N* NaOH, 然后再逐滴加入 0.05 *N* NaOH 至呈玫瑰红色(用酚酞作指示剂), 将 pH 调到 9.4。试样的 pH 值用带有微量测定附件的 pH 计(ЛПНУ-01 型)测量, 并以这样品作标准用肉眼进行比较把全部试样都调到 pH9.4。用 5 毫升乙醚将试样抽提三次(每次振荡 2 分钟)以除去未氧化的二甲替苯胺。用水泵抽去乙醚。第三次抽提后, 将试样敞口放 20 分钟以蒸发掉残留的乙醚, 然后加入 12 滴 5% TCA, 将 pH 调到 2.4。加入 0.2 毫升 0.1 *M* NaNO₂ 溶液, 加入 pH2.4 的柠檬酸缓冲液使试样的体积为 3 毫升。将试管在 60°C 水浴中放置 5 分钟以显色。用 CФ-4A 型分光光度计在波长 420 nm 测量试样的光密度。应用对-苯替甲亚硝铵的克分子消光系数 $8.2 \times 10^3 \text{cm}^{-1} \times M^{-1}$ (Ziegler, Pettit, 1964) 计算酶活力。大鼠肝脏微粒体 *N*-加氧酶反应的最大速度为每 1 分钟每 1 毫克蛋白质 3~4 n*M*。

对-羟化酶活力

苯胺对位羟化作用的速度可根据对-氨基苯酚形成的量来测定。反应是在有 NADP·H 及氧存在时在细胞色素 P₄₅₀ 分子上进行的。



对氨基苯酚与苯酚相接合后在有 Na₂CO₃ 存在时形成蓝色醌酚复合物:



测定过程 反应液体积为 1 毫升, 含有 40 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.3)、16 mM $MgCl_2$ 、3 mM NADP·H 及 ~2 毫克微粒体蛋白质。加入苯胺至最终浓度为 3 mM 使反应开始进行。对照组中在反应终止后加入 NADP·H。在不停的搅拌下在 37°C 保温 20 分钟。加 0.5 毫升 15% TCA 以终止反应。3500g 离心 10 分钟后, 取 1 毫升上清液加入 0.5 毫升 10% Na_2CO_3 , 1.5 毫升 2% 苯酚 (溶于 0.2 N NaOH 中) 以测定对-氨基苯酚的含量。将试样在 37°C 水浴中放置 30 分钟以显色。用日立-124 分光光度计在波长 630 nm 测量光密度。

酶活力的大小可根据以对-氨基苯酚标准溶液制作的标准曲线来计算。苯胺对位羟化作用的最大速度为每 1 分钟每 1 毫克蛋白质 0.6~0.8 nM。

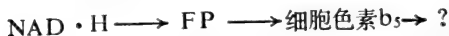
在建立每一个实验方法时, 保温混合液的成分及保温时间是这样选择的, 即能使加入试样中的蛋白质量与所形成的产物量之间有直线关系。

加入电子受体测定氧化还原酶活力的方法

测定氧化还原酶活力时应用了人工合成的电子受体: 2, 6-二氯酚靛酚, 细胞色素 c, 铁氰化钾 $K_3[Fe(CN)_6]$ 及新三苯基氯化四氮唑 (Neo-tetrazolium chloride, 缩写 NTC)。NADP·H (NAD·H): 2, 6-二氯酚靛酚-, 细胞色素 c-还原酶及铁氰化物-还原酶的活力按 Dallner(1963)的方法测定。而 NADP·H (NAD·H): NTC-还原酶的活力按照 Roering 等(1972)的方法测定。

方法的原理是根据电子受体从氧化型转变成还原型时光吸收值的改变。还原链上电子脱落的部位在图解中用虚线箭头表示。

NADP·H(NAD·H): 2, 6-二氯酚靛酚-还原酶活力 反应液体积 3 毫升, 含有: 100 μM NADP·H(NAD·H), 40 μM 2, 6-二氯



NADP·H (NAD·H): 细胞色素 c-还原酶的活力 反应液的成分: 100 μ M NADP·H(NAD·H)、50 μ M 细胞色素 c, 330 μ M NaCN, 100 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)、~40 毫克微粒体蛋白(以 NADP·H 为底物时)或~15 毫克微粒体蛋白(以 NAD·H 为底物时), 反应液总体积为 3 毫升。细胞色素 c 还原速度的测量是用日立-124 或 C Φ -4A 型分光光度计, 在保温比色杯中于 30°C 在波长 550 nm 下进行的。细胞色素 c 的克分子消光系数(还原型减去氧化型)为 $18.5 \times 10^3 \text{cm}^{-1} \times M^{-1}$ 。以 NADP·H 为底物时的最

大反应速度为每1分钟每1毫克蛋白质 $180\sim 200\text{ nM}$, 而以 $\text{NAD}\cdot\text{H}$ 为底物时则为 $1500\sim 1900\text{ nM}$ 。

$\text{NADP}\cdot\text{H}(\text{NAD}\cdot\text{H}) : \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -还原酶的活力 反应液总体积为3毫升, 含有: $100\text{ }\mu\text{M}$ $\text{NADP}\cdot\text{H}(\text{NAD}\cdot\text{H})$ 、 $330\text{ }\mu\text{M}$ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、 100 mM Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}7.4$)、 ~ 500 微克微粒体蛋白(对 $\text{NADP}\cdot\text{H} : \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -还原酶来说) 或 ~ 20 微克蛋白(测定 $\text{NAD}\cdot\text{H}$: 铁氰化物-还原酶活力时)。铁氰化物还原速度的测定与上述酶活力的测定相同, 不过是在波长 420 nm 下测定。氧化铁氰化物的克分子消光系数为 $1.02 \times 10^3\text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ 。以 $\text{NADP}\cdot\text{H}$ 为底物时反应的最大速度为每1分钟每1毫克蛋白质 $150\sim 200\text{ nM}$, 而以 $\text{NADP}\cdot\text{H}$ 为底物时则为 $5000\sim 6000\text{ nM}$ 。

$\text{NADP}\cdot\text{H}(\text{NAD}\cdot\text{H}) : \text{NTC}$ 蓝-还原酶活力 反应液体积为3毫升, 含有: $50\text{ }\mu\text{M}$ $\text{NADP}\cdot\text{H}(\text{NAD}\cdot\text{H})$, $20\text{ }\mu\text{M}$ NTC 蓝, 100 mM Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}7.4$)、 ~ 100 微克微粒体蛋白质(对 $\text{NADP}\cdot\text{H} : \text{NTC}$ -还原酶反应来说) 或 ~ 20 微克蛋白质(测定 $\text{NAD}\cdot\text{H}$ - NTC 蓝-还原酶活力时)。NTC 还原速度的测量用日立-124 分光光度计用保温比色杯于 30°C 波长 550 nm 下测定, 测定时间为 $2\sim 3$ 分钟。氧化NTC的克分子消光系数为 $28.8 \times 10^3\text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ 。以 $\text{NADP}\cdot\text{H}$ 为底物时反应的最大速度为每1分钟每1毫克蛋白质 $20\sim 50\text{ nM}$, 而以 $\text{NAD}\cdot\text{H}$ 为底物时则为每1分钟每1毫克蛋白质 $90\sim 100\text{ nM}$ 。

测量微粒体呼吸活力的方法

荧光法 方法的原理是根据 $\text{NADP}\cdot\text{H}$ 及 $\text{NAD}\cdot\text{H}$ 在氧化过程中荧光衰退的速度的测量。

测定过程 反应液体积3毫升, 内含: 100 mM Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}7.4$)及 ~ 3 毫克微粒体蛋白。加入 $\text{NADP}\cdot\text{H}$ 或 $\text{NAD}\cdot\text{H}$

至 $33\mu M$ 浓度, 开始进行反应, 用荧光计 $\Xi\Phi-3M$ 型(激发滤光片 336 nm , 记录滤光片 420 nm) 用 $30^\circ C$ 保温比色杯及自动记录仪 KCI-4 记录荧光强度。

大鼠肝脏微粒体中 $NADP\cdot H$ 的氧化速度为每 1 分钟每 1 毫克蛋白质 $4\sim 6\text{ nM}$, 而 $NAD\cdot H$ 则为每 1 分钟每 1 毫克蛋白质 $2\sim 3\text{ nM}$ 。

极谱法 是用开放型白金电极在 LP-60 型极谱仪上测量微粒体制剂耗氧的速度。

测定过程 反应液体积为 1 毫升, 内含: 100 mM Tris-HCl 缓冲液($pH7.4$)及 ~ 4 毫克微粒体蛋白, 加入 $NADP\cdot H$ 或 $NAD\cdot H$ 溶液至 1 mM 开始进行反应。在 $30^\circ C$ 下记录 $2\sim 3$ 分钟。为了抑制强烈耗氧的不饱和脂肪酸的过氧化作用, 应在极谱仪的小杯中加入 EDTA 至浓度为 0.6 mM 。

微粒体中无 EDTA 时, 对氧需求的速度为每 1 分钟每 1 毫克微粒体为 $7\sim 9\text{ nM}$, 有 0.6 mM EDTA 存在时则为每 1 分钟每 1 毫克微粒体 $3\sim 5\text{ nM}$ 。

测定微粒体组分中细胞色素 b_5 及 p_{450} 的含量及

氧化-还原速度的方法

细胞色素 b_5 及 p_{450} 含量的测定

细胞色素 b_5 含量的测定是根据氧化型及还原型血红蛋白光吸收值的差别来测定的。而细胞色素 p_{450} 的测定则是根据还原型细胞色素 p_{450} 与一氧化碳形成的复合物在波长 450 nm 处的吸收值来测量的。

测定过程 细胞色素 b_5 及 p_{450} 含量的测定是用 C Φ -10 型及 C Φ -14 型(双光束)或日立-356 型(双光束)分光光度计在微粒体悬浮液中[每毫升中含 100 或 200 mM Tris-HCl 缓冲液($pH7.4$)

及 1~2 毫克蛋白质]进行的。用 CФ-10 型分光光度计时,采用圆柱形比色杯,杯高 12 mm,直径 26 mm。每个比色杯中加入 4 毫升反应液,将透射光旋钮(Кулачка светопропускания)上的零线调到 70% 的水平,在波长 400~500 nm 范围内进行记录。在右边的比色杯中,根据实验的目的加入少量连二亚硫酸钠结晶或其它还原剂。记录细胞色素 b_5 的差光谱。这时,最低吸收值在波长 408 nm,而最大吸收值在 428 nm。408 nm 和 428 nm 之间吸收值之差 ($\Delta A_{408-428}$) 可作为细胞色素 c 含量的指标。用日立-356 型分光光度计测量时采用下列波长: 408~424 及 424~475 nm。用克分子消光系数 $164 \times 10^3 \text{cm}^{-1} \times M^{-1}$ (Omura, Sato, 1964) 来计算微粒体组分中细胞色素 b_5 的含量为每 1 分钟每 1 毫克微粒体 0.4~0.6 nM。

细胞色素 P_{450} 含量的测定用 CФ-10 型双光束线路进行。记录零线后,经左边比色杯通一氧化碳 1 分钟(一氧化碳是用浓甲酸与硫酸混合后产生的,并将 CO 通过连苯三酚 A 溶液以纯化)。然后在两个比色杯中都加入少量连二亚硫酸盐结晶并记录差光谱。波长 450 nm 的最大吸收与波长 475 或 490 nm 之最低吸收之间的差值是微粒体中血红蛋白含量的指标。在用透射光旋钮记录时,标准纸上的刻度值要比用光密度旋钮记录时小 5 倍。有时,用我们实验室自己改装的 CФ-10 型分光光度计测量细胞色素的含量。改装后,记录带上标尺的刻度值比透射光标尺上的要小 5、10 及 20 倍。

在日立-356 型分光光度计上测定细胞色素 P_{450} 的含量时,可以测量 $\Delta A_{450-475}$ 。根据克分子消光系数 $91 \times 10^3 \text{cm}^{-1} \times M^{-1}$ (Omura, Sato, 1964) 计算微粒体组分中细胞色素 P_{450} 的含量,其值为每 1 分钟每 1 毫克微粒体 0.8~0.9 nM。

细胞色素 b_5 及 P_{450} 还原-氧化速度的测量

在有氧条件下用双光束分光光度计 CΦ-10 或日立-356 的保温比色杯中, 在 25° 或 30°C 研究了细胞色素 b_5 及 P_{450} 的还原-氧化速度。将每毫升中含有 1 毫克微粒体蛋白质及 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 的反应液加入比色杯中, 记下零线, 然后在试验比色杯中加 NADP·H 或 NAD·H 溶液至浓度为 $33\mu\text{M}$ 和 $7\mu\text{M}$ 。先经实验比色杯通一氧化碳 1 分钟后记录细胞色素 P_{450} 的光谱。用 CΦ-10 分光光度计时每隔 30 秒钟记录细胞色素的差光谱。用细胞色素的最大还原性 (R_m) 的水平及半氧化时期 ($t_{1/2}$) 作为细胞色素还原-氧化速度的指标。在正常的 $t_{1/2}$ 的本底上 R_m 值的降低或升高都说明有细胞色素还原反应速度的改变。这些指标的同时改变证明还原型血红蛋白氧化速度的加快或减慢。

缺氧条件下细胞色素 b_5 及 P_{450} 还原速度的测量在双光束分光光度计日立-356 的 1 厘米比色杯中 (25°C) 进行。反应液体积为 3 毫升, 内含: 40 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)、2~3 毫克微粒体蛋白、 $2 \times 10^{-5} M$ 鱼藤酮 (rotenone)、15 mM 琥珀酸盐、2~3 毫克亚线粒体微粒蛋白质。根据细胞色素 $a+a_3$ 在 $\Delta A_{603-630}$ 范围内的还原来控制缺氧环境的出现。用特殊的快速混匀方法加入 NADP·H 或 NAD·H 至终浓度为 $33\mu\text{M}$; 让带有吡啶二核苷酸溶液的带孔薄板在 0.5 秒钟内通过比色杯内的液体。在记录细胞色素 P_{450} 的还原速度时, 先经比色杯通入 CO 。根据 $\Delta A_{424-475}$ 测定细胞色素 b_5 的还原, 而细胞色素 P_{450} 的还原按 $\Delta A_{450-475}$ 来测定。

动物组织中脂类物质的某些过氧化产物的测定方法

在许多病理状态下发现在组织中有脂类的过氧化产物的积

累, 并伴随出现一系列酶系统功能的破坏(Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, 1972)。

为了获得动物组织中脂类物质过氧化作用的概念, 最好是测定二烯的轭合作用(在过氧化作用的早期出现), 脂类过氧化物(在过氧化作用的较晚的阶段出现), 最后还要测定丙二酸二醛, 它是脂类物质过氧化作用的最重要的产物之一。

不饱和高级脂肪酸二烯轭合作用的测定方法

И. Д. Стальная

方法的原理

在过氧化作用过程中的游离基形成阶段, 在多聚不饱和高级脂肪酸分子中生成共轭双键系统, 同时在吸收光谱中出现一个新的最大吸收—— $\lambda_{\text{最大}} = 233 \text{ nm}$; $\epsilon = 2.2 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \times M^{-1}$ (Recknagel, Ghoshal, 1966)。

试 剂

正庚烷。

异丙醇。

0.9%氯化钾溶液。

0.1M磷酸缓冲液(pH7.6)。

下面叙述大鼠肉芽纤维组织匀浆中及线粒体组分中二烯轭合作用的测定。

测 定 过 程

准确称出一定量的组织, 在 0.9%氯化钾溶液中洗去血污, 在液氮中冰冻, 在冷却的瓷研钵中仔细磨碎。按照 Schneider(1948)

的方法从肉芽纤维组织中分离出线粒体。将线粒体在 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中洗涤后重新悬浮于 5 毫升同样的缓冲液中。

然后将 1.0~1.5 克组织粉末或 1 毫升制备好的线粒体悬浮液 (10~15 毫克蛋白质) 在一个 Potter-Elvehjem 玻璃匀浆器中与 9 毫升庚烷-异丙醇 (体积比为 1:1) 混合液一起研磨 15 分钟。将所得的悬浮液放于聚乙烯试管中, 用塞子塞紧以防离心时萃取相挥发。将试样在 4000g 离心 10 分钟。将上清液转移到一个刻度试管中, 加入十分之一体积蒸馏水。振荡及两相分开后, 吸出庚烷相。如此重复一次。每 0.5 毫升中按 1:5~1:10 的体积比加入乙醇。用 CФ-16 分光光度计, 波长 233 nm, 石英杯 (光径 10 毫米) 测定样品的光密度。用只含抽提相的样品, 或用 1 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH7.6) 代替 1 毫升线粒体悬浮液作为对照。

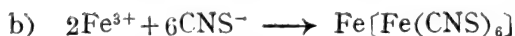
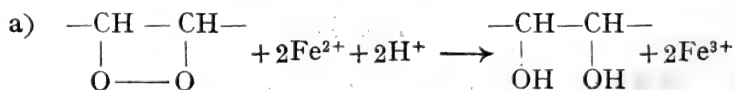
根据多聚不饱和高级脂肪酸的共轭二烯在波长 233 nm 时的克分子消光系数为 $2.2 \times 10^5 \text{cm}^{-1} \times M^{-1}$ 计算样品中二烯化合物的含量。

用硫氰酸铵测定脂类过氧化物的方法

Л. А. Романова, И. Д. Стальная

方法原理

在稀释的脂类过氧化物水溶液中将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} , 后者可以通过与硫氰酸铵的颜色反应在 480 nm 有最大吸收值而被测定 (Summer, 1943)。



试 剂

5%摩尔盐(六水合硫酸亚铁铵)溶液, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 用 3% 盐酸溶液重结晶。

浓盐酸。

20% 硫氰酸铵(重结晶)溶液。

含有 0.175 M KCl 的 0.025 M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)。

50% 三氯乙酸溶液。

生物材料的准备

以大鼠肝脏线粒体组分的制备及测定其中过氧化氢的含量作为例子。

按照 Schneider (1948) 的方法并作某些改进后从大鼠肝脏分离线粒体组分。将 10% 肝组织匀浆冷冻离心 10 分钟, 600g。弃去含有细胞核及未破碎的细胞器的沉淀。将上清液在 12500g 离心 20 分钟。将所得线粒体沉淀悬浮于其体积为匀浆液体积 $\frac{1}{10}$ 的 0.175 M KCl—0.025 M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 中, 12500g 离心 15 分钟, 将沉淀重新悬浮于 10 毫升上述缓冲液中。

测定的过程

将按上法制得的线粒体组分加到离心管中, 每管加 2 毫升(蛋白质浓度为每毫升 7~8 毫克), 再加入 0.2 毫升 50% 三氯乙酸溶液(最终浓度为 5%) 以沉淀蛋白质。离心分离出所形成的沉淀 (4000g)。在 2 毫升上清液中加入 96% 乙醇至 27 毫升。每 27 毫升中加入 0.2 毫升浓盐酸及 0.025 毫升 5% 摩尔盐的盐酸溶液 (3% 盐酸溶液), 剧烈摇动样品, 准确的经过 30 秒钟后加入 1 毫升

20% 硫氰酸铵, 于是就显出紫红色。用 96% 乙醇代替上清液作为对照管。加入硫氰酸铵后 10 分钟测定光密度。用 CФ-16 分光光度计, 波长 480 nm, 光径 10 毫米, 以对照管作空白进行测定。

生物材料中过氧化氢的相对含量按波长 480 nm 的光密度值计算。

例如(表 8)对完整线粒体组分及 0.1 mM FeSO₄ 中在 37°C 保温不同时间以后的线粒体组分中的过氧化氢相对含量进行了测定, 并建立了 Fe²⁺ 促进脂类物质过氧化作用的条件。用未经 FeSO₄ 处理过的样品作为对照。

表 8 两价铁离子对大鼠肝脏脂类过氧化作用的影响

在 0.1mM FeSO ₄ 中保温的时间(分钟)	E ₄₈₀ *
0	0.025
5	0.068
10	0.100
15	0.070
30	0.044

* 所列数值是四组平行实验的算术平均数。

用硫巴比妥酸测定丙二酸二醛的方法

И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили

方法原理

丙二酸二醛在酸性环境中在高温下与 2-硫巴比妥酸反应, 同时形成在波长 532 nm 具有最大吸收的有色三甲基复合物, 这一复合物的克分子消光系数 $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{cm}^{-1} \times M^{-1}$ (Hunter et al., 1963)。

试 剂

含 0.175 M KCl 的 0.025 M Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}7.4$)。

17% 三氯乙酸溶液。

0.8% 2-硫巴比妥酸水溶液。

生物材料的准备

以大鼠肝脏肉芽纤维组织和线粒体组分匀浆的制备为例。

准确称取一定量的组织,在液氮中冰冻,在冷却的瓷研钵中仔细磨碎。取 1 克组织粉末在 3 毫升上述 Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}7.4$) 中进行匀浆。每个试样中各加入 $6\sim 18$ 毫克蛋白质 (一般溶于 0.5 毫升缓冲液中)。

按改进后的 Schneider 法 (1948) (见 57 页) 从大鼠肝脏分离线粒体组分。必须用 $\text{pH}7.4$ 的缓冲液洗涤线粒体沉淀以除去微量的蔗糖,后者与 2-硫巴比妥酸反应时会干扰显色。

测 定 过 程

将按上法制得的在 $\text{pH}7.4$ 缓冲液中的生物材料 (组织匀浆或线粒体组分) 加到离心管中,每管 2.5 毫升,加入 1 毫升 17% 三氯乙酸 (最终浓度为 5%) 以沉淀蛋白质。 4000g 离心 10 分钟,除去所形成的沉淀。将上清液转移到许多试管中,每管 0.2 毫升。各个试管中加入 1 毫升 0.8% 2-硫巴比妥酸水溶液,将样品置沸水浴中 10 分钟。用 $\text{pH}7.4$ 的缓冲液代替上清液作为对照。显出玫瑰红色后,将样品冷却到室温,以对照管为空白测定波长 532 nm 的光密度 ($\text{C}\Phi\text{-16}$ 分光光度计,比色杯光径 1 cm)。

应用上述克分子消光系数的数值计算丙二酸二醛的含量,并将所得的结果用每个样品的 nM 数表示。

我们拟用不同浓度的 Fe^{2+} 对大鼠肝脏线粒体组分中形成丙二酸二醛的影响的研究作为一个实例。

实验条件 在实验组的每个试管中含有 40 毫克溶于 pH7.4 的缓冲液中的线粒体蛋白质，加入用 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 配制的溶液，使试样中 Fe^{2+} 的最终浓度分别达到表 9 中所列的浓度。试样的最终体积为 10 毫升，加入 Fe^{2+} 后将样品在 Warburg 恒温器中 32°C 保温 60 分钟。保温终止后，从样品中取出 2.5 毫升以测定丙二酸二醛。用未经 FeSO_4 处理过的样品作为对照。

表 9 两价铁离子对大鼠肝脏丙二酸二醛形成的促进作用

FeSO_4 浓度(M)	丙二酸二醛的形成(每个样品中的 nM 数)。(表中所列数值为 8 个平行测定的算术平均值 \pm 平均误差)
0	2.2 ± 1.4
10^{-6}	7.9 ± 2.2
10^{-5}	17.4 ± 2.0
10^{-4}	30.3 ± 4.0

用大肠杆菌色氨酸酶蛋白测定

5'-磷酸吡哆醛的微量酶学方法

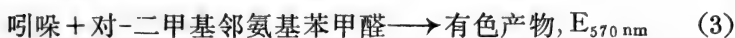
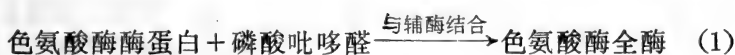
Ю. В. Букин, А. В. Сергеев

应用大肠杆菌色氨酸酶蛋白(Okada et al., 1970; Haskell, Snell, 1972)及粪链球菌(*S. faecalis*)酪氨酸脱羧酶蛋白(Sundaresan, Coursin, 1970)最近几年已经研究出了测定 5'-磷酸吡哆醛(磷酸吡哆醛是维生素 B_6 的主要辅酶类型)的高灵敏度酶学方法。上述方法要求采用放射性同位素标记的底物或要求制备高纯度的酶蛋白制剂。但我们建立了一个较为简单的在色氨酸酶蛋白系统中测定磷酸吡哆醛的改良法，可以测定在 1.5 毫升

待测溶液中的 1~40 ng 的辅酶。测定的过程并不要求事先从待测的混合物中分离出磷酸吡哆醛来，也不要求采用放射性化合物和把色氨酸酶蛋白制备成单独的蛋白质形式。

方 法 原 理

在色氨酸酶蛋白系统中测定磷酸吡哆醛是根据下列的反应顺序(1~3)：



在标准条件下,反应(1)中形成的色氨酸酶全酶的量及反应(2)中 L-色氨酸在酶促降解时吲哚的形成是该系统中磷酸吡哆醛浓度的函数。在酸性介质中的吲哚与对-二甲基邻氨基苯甲醛形成稳定的红色产物,其浓度可用分光光度法加以测定。

试 剂 及 材 料

磷酸吡哆醛(一分子结晶水)的分子量为 265.16。将 1 毫升 0.001 N KOH 中含有 0.1 毫克磷酸吡哆醛的原始溶液封存于安瓿中(-20°C, 暗处)可用 2~3 个月。溶液中磷酸吡哆醛的准确浓度用分光光度计测定(388 nm, 0.1 N KOH 中 $\epsilon = 6500$, pH 7.0 时 $\epsilon = 4900$)。在制作标准曲线前用重蒸馏水稀释原始磷酸吡哆醛溶液,直接制备含有 10 或 50 ng 磷酸吡哆醛的工作溶液。磷酸吡哆醛溶液应绝对避免见光。

0.1 M 磷酸钾缓冲液(pH 8.3)。

0.1 M 还原谷胱甘肽的 0.1 M 磷酸钾缓冲液(pH 8.3)。

0.05 M L-色氨酸溶液。将 L-色氨酸的称样溶于用盐酸酸化

后的重蒸馏水中。向此溶液加入几滴 0.1 M 磷酸钾缓冲液 (pH 8.3), 再用 0.2 N KOH 中和。

甲苯。

70% 三氯乙酸溶液。

5% 对-二甲基邻氨基苯甲醛的 96% 乙醇溶液(贮存于暗处)。

H₂SO₄ 与乙醇的混合液 (1 升 96% 乙醇中加 80 毫升浓 H₂SO₄)。

对-二甲基邻氨基苯甲醛的酸性乙醇溶液。用前直接制备: 将 1 份 5% 对-二甲基邻氨基苯甲醛的 96% 乙醇溶液与 9 份 H₂SO₄-乙醇混合液相混合。

10% HPO₃ 溶液。由 P₂O₅ 制备(配制法见后面)。

大肠杆菌色氨酸酶蛋白制剂 (菌体及酶蛋白的制备法见后面)。

从 P₂O₅ 制备 HPO₃

在一个瓷皿中放 50 克用蒸馏水结成的碎冰块, 分小批加入 8 克左右的 P₂O₅(化学纯)。将沉淀下来的胶状多聚磷酸凝块经烧结玻璃漏斗过滤除去, 或在 5000g 离心 30 分钟除去。根据密度或用甲基橙作指示剂滴定以测定 (HPO₃)_n 溶液的准确浓度。新制备的偏磷酸用蒸馏水稀释成 1.36 N 的溶液 (按 P₂O₅ 计算, 10.1% 溶液, d₄²⁰ 为 1.0764) 保存于冷处的溶液在两星期内是可行的。用于从组织中提取磷酸吡哆醛的 5% 偏磷酸工作液在应用前制备。

大肠杆菌菌体的制备(菌株 Круна, ATCC 8739 或 B/It 7-A)*

用于制备色氨酸酶的大肠杆菌培养基成分列于表 10。培养

* E. Coli 菌株来自美国 Berkly Snell, E. E. 教授。

B/It 7-A 的培养基要比培养 Крыка 的培养基复杂, 但是 B/It 7-A 的优点是在菌体中色氨酸酶的组成酶的含量较高。

表 10 大肠杆菌培养基成分

成 分	培养基 1	培养基 2	培养基 3
KH_2PO_4		3.0	7.5
$\text{KHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.0	9.5	21.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1.0	1.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.01	0.003
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.001	0.003
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.1	0.003
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			0.001
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			0.001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			0.001
NaCl			0.25
葡萄糖	1.0	2.0*	
吲 哚	0.01		0.25
L-色氨酸			0.33
酵母提取液	10.0		1.0
酪蛋白酶解液	10.0		20.0
琼 脂**	20.0	20.0	

* 种子培养时, 每升培养基中葡萄糖的含量提高到 10 克。

** 琼脂只加于斜面转接培养基中。

将大肠杆菌 (菌株 Крыка) 培养于肉汤-蛋白胨斜面上或培养在培养基 1 中 (见表 10)。将大肠杆菌 (B/It 7-A 突变株) 培养于培养基 2 斜面上 (表 10)。每月至少转接一次到新配制的培养基上, 种子在装有 100 毫升培养基 1 (菌株 Крыка) 或每升含 10 克葡

葡萄糖的 100 毫升培养基 2 (菌株 B/It 7-A) 的容积为 750 毫升的锥形瓶中于 37°C 培养 12~18 小时。为了充分通气, 将瓶子在圆形摇床上培养, 每分钟旋转 180~200 次。

制备大肠杆菌(菌株 *Крыка*) 菌体时, 在培养基 1 中接种 5% 体积的种子。在发酵罐中或大瓶子中或 750 毫升的锥形瓶中 (装 100 毫升培养基) 于 37°C 充分通气下培养 18~24 小时。

制备大肠杆菌(菌株 B/It7-A) 的菌体时, 在培养基 3 中接种 20% 体积的种子, 37°C 充分通气下培养 12 小时。

保温停止后将培养液冷却至 0~4°C。2~4°C 离心 15~20 分钟 (10000~15000 g), 以分离出细胞。用 20 倍体积的 0.15 M NaCl 溶液洗涤一次, 再用 3 倍体积的蒸馏水洗涤一次。按细胞湿重计算产率为每升培养液 3~4 克。将所得的湿菌体保存于 0°C, 并在 12~24 小时内用于制备色氨酸酶蛋白。也可将菌体先冷冻干燥。密封包装于 -20°C 下贮存的冷冻干燥的细胞至少在 6 个月内或更长的时间内仍保持原有的色氨酸酶活力。

色氨酸酶蛋白的制备

用超声波将细菌细胞破碎, 在等电点 pH 4.7 时从细胞提取液中沉淀色氨酸酶, 将有活力的沉淀进行透析, 用四氢化硼钠处理色氨酸酶蛋白的粗制剂以使残留的全酶失活。

试剂及材料

0.1 M (pH 7.0) 及 1 M (pH 7.3) 磷酸钾缓冲液。

EDTA(游离酸)。

2-巯基乙醇。

1 M 及 0.1 M 乙酸溶液。

NaBH₄ 或 KBH₄。

Sephadex G-25(柱子的尺寸: 2.5×40 厘米), 预先用 $0.1 M$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.3)平衡。

制 备 过 程

制备大肠杆菌色氨酸酶蛋白的全部过程都在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 进行。将大肠杆菌的湿菌体(10 克)或冷冻干燥的细胞(2 克)悬浮于 50 毫升含有 2 mM EDTA 及 5 mM 2-巯基乙醇的 $0.1 M$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中, 用超声波破碎器(20 千赫兹, 50 瓦, $5 \sim 10$ 分钟)破碎细胞, 离心($30000g$, 20 分钟)除去细胞碎片, 在不停的搅拌下用 $1 M$ 乙酸将上清液酸化到 pH 4.7, 离心收集形成的沉淀($30000 g$, 30 分钟)。将沉淀悬浮于 50 毫升蒸馏水中, 对 $8 \sim 10$ 升水在搅拌下透析 12 小时。透析后将 5 毫升 $1 M$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.3)加入所得的色氨酸酶蛋白粗制剂(约 50 毫升)中, 再在不停的搅拌下加入 10 毫克 NaBH_4 或 KBH_4 (四氢化硼钠的最终浓度约为 $0.005 M$ 左右)。将酶蛋白溶液放置 10 分钟, 同时加入几滴 $0.1 M$ 乙酸使 pH 值维持在 $7.2 \sim 7.4$ 范围内。然后对 10 升水透析 $10 \sim 15$ 小时, 或者经 Sephadex G-25 柱作凝胶过滤。用蒸馏水将所得色氨酸酶蛋白的浓度稀释至每毫升含 1 毫克蛋白质(对菌株 Крыка 而言)或每毫升 0.1 毫克蛋白质(对菌株 B/It 7-A 而言)。按 Lowry (1951)法测定蛋白质的含量。

在标准条件下以磷酸吡哆醛作底物测定时色氨酸酶蛋白制剂的残留活力通常在 $0.03 \sim 0.06 E_{570\text{nm}}$ 的范围内。如果残留活力(本底)升高到 $0.1 E$, 那么在等电点下沉淀有活力蛋白质的操作和用 NaBH_4 处理色氨酸酶蛋白以及透析的操作应再重复一次。将所得色氨酸酶蛋白溶液封存于安瓿中, -20°C 下保存。色氨酸酶蛋白制剂在 $2 \sim 6$ 个月内适用。由于酶制剂的活力不断下降, 所以用于测定磷酸吡哆醛的标准曲线必须每 $2 \sim 3$ 星期重做一次。

从组织中提取磷酸吡哆醛

所有涉及从生物材料中提取磷酸吡哆醛的工作以及测定其活力的工作都应在极微弱的光照下或在红光下进行。根据不同的研究对象,称取 5~10 毫克或 50~100 毫克生物组织材料在一个玻璃匀浆器中与等体积 10% HPO_3 溶液进行匀浆,加入 18 倍于偏磷酸体积分的蒸馏水后再将组织混合液继续进行匀浆。将所得的组织匀浆液在 80°C 水浴中加热 15 分钟,然后将混合液冷却,离心。上清液用于测定磷酸吡哆醛。测定磷酸吡哆醛的样品其体积不应超过 0.25 毫升。

在含有色氨酸酶蛋白的系统中测定磷酸吡哆醛

在带有磨口塞的 20~25 毫升的烧瓶中加入: 1) 0.05~0.2 毫升待测的组织提取液或 2 毫升水 (用于测定色氨酸酶蛋白的残留活力) 或磷酸吡哆醛标准溶液 (制作标准曲线时用每 0.1~0.2 毫升含 1~50 ng 的溶液); 2) 定量地加入 0.2 N KOH 溶液以中和组织提取液中的 HPO_3 , 使 pH 达到 8.0~8.3, 加入水至总体积为 2 毫升; 3) 3 毫升甲苯; 4) 0.45 毫升新配制的色氨酸酶蛋白工作溶液, 此工作溶液含有 0.1 毫升酶蛋白, 0.1 毫升 0.1 M 还原谷胱甘肽溶液及 0.25 毫升 0.1 M 磷酸钾缓冲液 (pH 8.3)。在振荡下将样品在 37°C 预热 10~15 分钟, 然后加入 0.2 毫升 0.05 M L-色氨酸溶液, 将样品在 37°C 不停地振荡下保温 60 分钟。加入 0.2 毫升 70% 三氯乙酸以终止反应, 为了完全将吡哆抽提至甲苯中, 应将样品剧烈振荡。将混合液转移到离心管中, 低速离心 (65g, 3~5 分钟) 使两相分开。从上相 (甲苯相) 取出 1.5 毫升作分析。将待分析的甲苯放入含有 5 毫升新配制的对-二甲基邻氨基苯甲醛的硫酸-乙醇溶液的试管中。对照组中只加入纯甲苯。将样品仔细

搅匀经过 15 分钟后测定溶液的光密度, 用 CФ-4A 型分光光度计, 波长 570 nm, 1 cm 比色杯, 以对照样品作空白, 在室温下至少在 4~5 小时内溶液的颜色是稳定的。

样品中磷酸吡哆醛的含量可根据用已知量的标准磷酸吡哆醛溶液制作的标准曲线来测定, 根据标准曲线计算出所研究的组织中磷酸吡哆醛的含量。测定标准溶液中磷酸吡哆醛方法的误差范围在 $\pm 3\%$ 。测定生物材料中的磷酸吡哆醛时, 此方法的误差达到 $\pm 6\%$ 。

方法的应用

这个方法可用于测定动物及人体组织、植物组织中的磷酸吡哆醛的含量。小鼠肝脏、脑及脾脏中每克湿组织中磷酸吡哆醛的正常含量各为 2.16 ± 0.07 , 7.8 ± 0.67 , 0.9 ± 0.05 微克 (Ю. В. Букин, А. В. Сергеев, 1970)。只需要用 1~5 毫克组织就足够进行分析, 所以这个方法可以用于临床上分析活检取得的少量样品材料。因为色氨酸酶蛋白制剂不含吡哆醛激酶, 所以这个方法可以直接在含有 ATP 及吡哆醛的反应液中测定在吡哆醛激酶反应中形成的磷酸吡哆醛 (见 Ю. В. Букин, 67 页)。

测定哺乳动物及人体组织中磷酸吡哆醛

激酶活力的微量方法

Ю. В. Букин

磷酸吡哆醛激酶 (ATP: 吡哆醛-5-磷酸转移酶, EC 2.7.1.35) 是保证动物及人体中合成磷酸吡哆醛及磷酸吡哆胺 (维生素 B₆ 的辅酶形式) 的关键酶。当有 ATP 及有某些两价金属离子存在时, 这个酶可以使维生素 B₆ 的三种形式都磷酸化, 并形成相应的 5'-

磷酸酯: 吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺 + ATP \longrightarrow 磷酸吡哆醇、磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺 + ADP。

方法原理

在有吡哆醛、ATP 及 Zn^{2+} 存在时, 吡哆醛激酶催化反应中所形成的磷酸吡哆醛可以在大肠杆菌色氨酸酶蛋白的体系中进行测定(见 Ю. В. Букин, А. В. Сергеев, 60 页)。这个方法不要求从反应液中分离出磷酸吡哆醛来。上述测定的原理早先已由 McCormick 等人 (1961, 1970) 加以应用。我们所研究的改良法 (Ю. В. Букин, 1973), 其特点是具有很高的灵敏度, 并且可以定量测定组织匀浆中及提取液中的吡哆醛激酶活力。

试剂及材料

0.077 M 磷酸钾缓冲液 (pH 5.8)。

0.25 M 蔗糖溶液 (pH 7.0)。

用缓冲液新配制的 2.5 mM 吡哆醛 (盐酸盐) 溶液。

用缓冲液新配制的 2.5 mM ATP- Na_2 溶液。

用蒸馏水配制的 0.1 mM $ZnSO_4$ 或 $Zn(CH_3COO)_2$ 溶液。

底物混合液——将吡哆醛、ATP 及 Zn^{2+} 溶液在应用前按 2:2:1 的比例加以混合。

大肠杆菌色氨酸酶蛋白制剂及测定磷酸吡哆醛的其它试剂 (见 Ю. В. Букин, А. В. Сергеев, 60 页)。

测定的过程

用于分析的生物组织的制备的全部操作都应在 $0\sim 4^\circ C$ 进行。用微量扭力天平 (分度值为 50 微克) 称取 5~10 毫克组织, 在一个玻璃匀浆器中与一定体积的缓冲液或蔗糖溶液仔细地进行匀浆。

加入缓冲液或蔗糖溶液后使匀浆中组织的含量为每毫升 1 毫克。测定组织抽提液中的酶活力时, 将匀浆离心 15 分钟 (10000~25000g), 用上清液作分析。

在含有 1 毫升底物混合液 ($1\mu M$ 吡哆醛, $1\mu M$ ATP, $0.02\mu M$ Zn^{2+}) 的试样中, 加入 0.2~1.0 毫升组织匀浆或组织抽提液, 加缓冲液至总体积为 2 毫升。用等渗蔗糖溶液制备匀浆的试样中则加入 0.25 毫升组织匀浆或抽提液。把试样在 $37^{\circ}C$ 保温 15~60 分钟使酶促反应开始。然后在沸水浴中放 3 分钟以使反应终止。对照组中当底物混合液中加入组织匀浆或抽提液后就立刻在沸水浴中加热将酶杀死。将加热后的试样冷却, 在测定磷酸吡哆醛以前一直存放于 $0\sim4^{\circ}C$ 中。在 3~4 小时内上述样品中的磷酸吡哆醛含量不会降低。应当强调的是: 保温、加热杀死酶、试样的保存以及后来磷酸吡哆醛的测定等工作都必须在黑暗中或在红光下进行, 以防止磷酸吡哆醛的破坏。

为了测定保温时试样中所生成的磷酸吡哆醛, 在含有色氨酸酶蛋白的系统加入 0.05~1.0 毫升待测溶液。在有些情况下, 如当吡哆醛激酶的活力很高或长时间保温时, 应在测定磷酸吡哆醛之前用缓冲液或蒸馏水将试样稀释几倍。在色氨酸酶蛋白的系统加入 1 毫升缓冲混合液不会影响磷酸吡哆醛的测定。

吡哆醛激酶活力单位的确定及酶比活力的计算。在 $37^{\circ}C$ 标准保温条件下, 1 分钟内形成 $1nM$ 磷酸吡哆醛的酶量定为吡哆醛激酶的 1 个活力单位 (U)。酶的活力以 1 克组织中所含的单位数表示。吡哆醛激酶的比活力以 1 毫克蛋白质中所含的单位数表示。蛋白质用 Lowry 法测定。

吡哆醛激酶的活力按下列公式计算:

$$\frac{\text{单位数}}{1\text{ g 组织}} = \frac{\Delta \text{磷酸吡哆醛}(\text{ng}) \times 2\text{ml} \times 1000\text{mg}}{t \text{ 分钟} \times 265 \times V\text{ml} \times P\text{mg}}$$

$$\frac{\text{单位数}}{1\text{mg 蛋白质}} = \frac{\Delta \text{磷酸吡哆醛}(\text{ng}) \times 2\text{ml} \times 1000 \mu\text{g}}{t \text{ 分钟} \times 265 \times V\text{ml} \times P \mu\text{g}}$$

式中 265——磷酸吡哆醛的分子量； Δ 磷酸吡哆醛 (ng/t 分钟 \times 265——在 1 分钟内试样中比对照中磷酸吡哆醛的增加值 (nM)；
P——试样中的组织含量 (毫克) 或者试样中蛋白质含量 (微克)；
V——测定磷酸吡哆醛时从试样中所取的体积。

在平行试验中测定吡哆醛激酶活力的方法可能误差在 $\pm 5\%$ 范围内。

影响吡哆醛激酶活力的条件

在小鼠肝、脑、肾及脾等组织匀浆中酶作用的最适 pH 为 5.8 左右 (Ю. В. Букин, 1973)。在 pH 5.5 或 6.1 时, 酶活力明显下降。在测定吡哆醛激酶的标准条件下, 所形成的磷酸吡哆醛量与试样中蛋白质含量 (在 20~100 μg 范围内) 和保温时间 (在 15~60 分钟内) 成正比 (Ю. В. Букин, 1973)。当试样中、组织匀浆中或抽提液中的蛋白质含量超过 1 毫克时酶的比活力急剧下降, 这可能是由于蛋白质与磷酸吡哆醛的非特异结合的缘故。

AMP 竞争性地抑制吡哆醛激酶, $K_i = 6.0 \times 10^{-5} M$ (McCormick et al., 1961)。脲是酶的强烈抑制剂 (McCormick, Snell, 1970)。所以, 如果用吡哆醛作底物, 在有羰基试剂存在时就不可能测定吡哆醛激酶的活力。

组织中吡哆醛激酶的分布

大多数小鼠组织的匀浆中及抽提液中吡哆醛激酶的活力按每克组织计算时几乎是相同的。组织抽提液中酶的比活力比匀浆中明显的要高, 这是由于吡哆醛激酶活力很低的隋性蛋白从抽提液中排入沉淀的结果。小鼠肝脏中吡哆醛激酶主要集中在细胞的除

去线粒体后的组分中。肝脏细胞线粒体中及细胞核中酶的活力十分低(Ю. В. Букин, 1973)。

我们测定的某些哺乳类及人的组织中吡哆醛激酶活力的资料列于表 11 中。

具有最高酶活力的器官是肾、肝和脑。人的恶性赘生物中(脑室管膜胚细胞瘤(Эпендимобластома)、肾上腺样癌、急性白血病人的淋巴细胞)的吡哆醛激酶活力比相应的对照组织要低(Ю. В. Букин, 1973)。根据我们的资料, 动物和人的肝脏与脑组织在个体发育过程中酶活力明显地增加。动物肝脏中吡哆醛激酶的活力与营养状况有关, 当膳食中蛋白质含量很高时酶活力明显升高。

方法的应用

可用于动物和人的各种组织及血液的有形成分的研究。由于只需0.5~1.0毫克组织即可进行分析, 故这个方法可用于临床, 测定骨髓、脑、肝、脾及其它器官的穿刺物中吡哆醛激酶的活力测定。

表 11 动物及人的不同组织中吡哆醛激酶的活力

研究的组织	小 鼠	大 鼠	人
脑	37.5±0.6	43.4±2.6	5.4~45.9(尸检)*
肝	40.0±0.9	56.4±11.6	2.0~28.5(尸检)
肾	52.9±3.8	84.6±2.0	45.5~51.4(活检)**
脾	19.1±0.9	25.2±1.5	5.2~5.8(尸检)
肺	14.8±2.2	17.1±1.2	9.4~11.2(尸检)
小肠粘膜	18.3±1.2	16.9±1.3	16.9~18.4(活检)
胰腺	16.9±1.9	18.3±2.5	
心	5.1±0.3	4.8±1.0	8.9~10.1(尸检)
股骨肌	1.8±0.1	2.0±0.4	1.8~3.2(尸检)

* 大脑额叶灰质。 ** 髓层。

哺乳动物组织中丝氨酸羟甲基转移酶活力的测定

A. B. Сегреев

丝氨酸羟甲基转移酶(EC 2.1.2.1)是属于含磷酸吡哆醛,并参与辅酶叶酸代谢的一种酶,它催化 L-丝氨酸的 β -碳原子转移到四氢叶酸上的可逆转移: $H_4\text{-叶酸} + L\text{-丝氨酸} \rightleftharpoons 5,10\text{-甲叉-}H_4\text{-叶酸} + \text{甘氨酸}$ 。反应中形成的 5,10-甲叉- H_4 -叶酸在次黄嘌呤核苷酸、胸腺嘧啶核苷酸及甲硫氨酸合成中起一碳单位供体的作用。已知丝氨酸转羟甲基酶参加线粒体中 L-丝氨酸的分解(Motokawa, Kikuchi, 1971)。

方法原理

在与 5,10-甲叉- H_4 -叶酸脱氢酶(EC 1.5.1.5)偶联的反应系统中测定丝氨酸羟甲基转移酶的活力是这个方法的基础。此方法的原理曾用于丝氨酸羟甲基转移酶制剂的纯化研究中 (Schirch, Mason, 1963)。在上述有 NADP 及 5,10-甲叉- H_4 -叶酸脱氢酶存在时由丝氨酸羟甲基转移酶催化的上述反应中形成的 5,10-甲叉- H_4 -叶酸被转变成 5,10-甲川- H_4 -叶酸,后者可用分光光度法加以测定。

$5,10\text{-甲叉-}H_4\text{-叶酸} + \text{NADP} \longrightarrow 5,10\text{-甲川-}H_4\text{-叶酸} + \text{NADP}\cdot H_2$ 。反应的最终产物 5,10-甲川- H_4 -叶酸在酸性环境中是稳定的,并在波长 355 nm 处具有最大吸收,这就保证了测定方法的可靠性及足够的灵敏度。测定动物组织中丝氨酸羟甲基转移酶活力的其它方法要么是不够正确 (Bertino et al., 1963),要么是涉及到应用 ^{14}C -丝氨酸及随之而来的繁琐的对放射性反应产物的分离(Motokawa, Kikuchi, 1971)。

试剂及材料

L-丝氨酸; H_4 -叶酸 (制备法见后面), 磷酸吡哆醛; NADP; 5, 10-甲叉- H_4 -叶酸脱氢酶的部分纯化的制剂 (制备法见后面)。

含有 0.1M 2-巯基乙醇的 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8)。

45% $HClO_4$ 溶液。

H_4 -叶酸的制备

通过叶酸及 H_2 -叶酸在 $NaHSO_3$ 和 $NaBH_4$ 分别参与下的逐步还原制备 H_4 -叶酸, 再从反应混合液中分离 H_4 -叶酸。纯化原理的根据是: H_4 -叶酸不同于叶酸及 H_2 -叶酸能从 DEAE-纤维素 (乙酸型) 柱上用稀乙酸洗脱下来 (Zakrzewski, Sansone, 1970)。

试剂 叶酸, 10% 抗坏血酸钾盐 (pH 6.0), 2-巯基乙醇, $NaHSO_3$, $NaBH_4$, DEAE-纤维素, 2N KOH; 2N HCl, 1M 乙酸缓冲液 (pH 6.0), 0.75M 乙酸, 无水乙醚。

DEAE-纤维素柱的置备 柱子的大小为 22×250 mm, 装 10 克 DEAE-纤维素 (OH⁻型)。用 1M 乙酸缓冲液 (pH 6.0) 流经柱子直至 OH⁻ 完全被 CH_3COO^- 所置换为止。再用 0.5 升蒸馏水洗涤柱子除去过剩的乙酸, 再用 200 毫升 1% 2-巯基乙醇流经柱子。

H_4 -叶酸的制备步骤 将 200 毫克叶酸悬浮于 20 毫升蒸馏水中, 加入 2 滴 2N KOH 溶液使它溶解。将此溶液与 50 毫升 10% 的抗坏血酸钾盐 (pH 6.0) 搅匀, 在混合液中加入 2 克 $NaHSO_3$ 。将此混合液在室温中放 10 分钟后, 冷却至 0°C, 加 2N HCl 将溶液的 pH 调到 2.8。离心收集沉淀。再将沉淀溶解于 50 毫升 10% 抗坏血酸钾盐 (pH 6.0) 中。加 2N HCl 将溶液的 pH 调到 2.8。 H_2 -叶酸的沉淀用 0.005 N HCl 洗涤 5 次, 并溶解于 10 毫升 0.1 M 磷

酸钾缓冲液(pH 7.6)中。然后加入 80 毫升 NaBH_4 ，将混合液在室温中放 10 分钟。为了破坏残留的 NaBH_4 ，在溶液中加入 1 毫升 $2N\text{HCl}$ ，经 2 分钟后用 $2N\text{KOH}$ 把溶液的 pH 调到 7.0。

将反应混合液上 DEAE-纤维素柱，梯度洗脱：在混合瓶中为 500 毫升 1% 的 2-巯基乙醇，在贮存瓶中为 500 毫升 $0.75M$ 乙酸溶液。记录从柱中流出液的光吸收值以观察洗脱的过程。洗脱曲线有三个峰，收集第三个峰的各管(总体积为 80~100 毫升)。将此溶液冷冻干燥。冻干制品再用 75~100 毫升无水乙醚处理。制剂中每 $1M\text{H}_4$ -叶酸含有 $1M$ 2-巯基乙醇，分子量为 541 (Zakrzewski, Sansone, 1970)。将制剂贮存在抽除空气的安瓿中，或贮存在充有氩气的安瓿中(-20°C)。

5, 10-甲叉- H_4 -叶酸脱氢酶的制备

部分纯化的酶制剂是按过去发表过的改良法(Osborn, Huenekens, 1957)进行制备的。

试剂及材料 四氢叶酸，甲醛，NADP。

含有 $0.1M$ 2-巯基乙醇的 $0.1M$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.8)。

$0.1M$ 磷酸钾缓冲液(pH 6.4)。

鱼精蛋白(硫酸盐)。

硫酸铵。Sephadex G-25(中粗)。

磷酸钙凝胶(制法见后面)。

雏鸡肝脏。采用 1 日龄的雏鸡新鲜冷冻肝脏。肝脏可在 -20°C 贮存 4 个月。

磷酸钙凝胶的制备 将 150 毫升氯化钙溶液(1 升中含 132 克 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)用水稀释到 1600 毫升，与 150 毫升磷酸三钠溶液(1 升中含有 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 152 克)一起振荡，用稀乙酸将混合液调到 pH 7.4，形成的沉淀用 20 升水洗涤 4 次。将离心收集的沉淀悬

浮于1升水中,在黑暗处放置1个月。离心收集的凝胶沉淀用0.5升0.1M磷酸钾缓冲液(pH6.4)洗涤2次,并在4℃贮存于此缓冲溶液中。

5, 10-甲叉-H₄-叶酸脱氢酶活力的测定法 这个方法是根据5, 10-甲川-H₄-叶酸含量的测定,后者是在甲醛、H₄-叶酸、NADP及酶存在时形成的。在溶液中甲醛迅即与H₄-叶酸发生非酶促反应,同时形成5, 10-甲叉-H₄-叶酸。测定酶活力的保温液内含有:5μM甲醛,1μMH₄-叶酸,1μMNADP(溶于2毫升含有0.1M2-巯基乙醇的0.1M磷酸钾缓冲液(pH7.8)中。加入0.05~0.1毫升蛋白质使反应开始,在37℃黑暗中使反应进行5~10分钟,加入1毫升45% HClO₄停止反应。对照组在加入蛋白质后立刻用HClO₄加以固定。离心分离沉淀,在波长355 nm将试样进行分光光度测定。所形成的5, 10-次甲基-H₄-叶酸按 $\epsilon = 22000$ 加以计算(Bertino et al., 1963)。在标准条件下,能在1分钟内形成1nM5, 10-甲川-H₄-叶酸的酶蛋白量定为5, 10-甲叉-H₄-叶酸脱氢酶的一个活力单位(U)。

5, 10-甲叉-H₄-叶酸脱氢酶的纯化 纯化酶的全部操作在2~4℃进行。将10克肝组织与10倍体积的0.1M磷酸钾缓冲液(pH7.6)进行匀浆。匀浆液在40000g离心40分钟。用1M乙酸溶液小心地将上清液的pH调到6.5,逐滴加入2.5毫升2%硫酸鱼精蛋白溶液。将此溶液在室温中放10分钟,然后离心15分钟(30000g),用2N KOH溶液将上清液的pH调到8.0。分小批将硫酸铵粉末加入溶液中,达到0.25饱和度。离心15分钟(30000g)后,所得的上清液中加硫酸铵至0.45饱和度。将离心所得沉淀溶于6毫升0.1M磷酸钾缓冲液(pH6.4)中,上Sephadex G-25柱。柱子预先用同样的磷酸缓冲液加以平衡。收集从柱中流出的蛋白质溶液并向此溶液中分小批加入磷酸钙凝胶50~60毫克(折算成磷酸钙

干重)。将混合液搅拌 5 分钟, 离心, 上清液用凝胶反复处理直至把酶全部从溶液中抽提出来。将离心所得的沉淀合并, 用 20 毫升 0.2 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.6), 从凝胶上将有活力的蛋白质洗脱下来。纯化过程及酶的产率列于表 12。5, 10-甲叉-H₄-叶酸脱氢酶制剂中含有微量的丝氨酸羟甲基转移酶。在 -20°C 保存时, 3~4 星期内仍有活力。

表 12 5, 10-甲叉-H₄-叶酸脱氢酶的纯化(实验例)

纯 化 步 骤	组 分 的 鉴 定			
	体积(ml)	总活力(U)	比 活 力 U/mg蛋白质	产 率 (%)
组织抽提液	100	1980	18	100
硫酸鱼精蛋白处理	98	1850	22	94
硫酸沉淀(0.25~0.45)	8	1300	36	66
从磷酸钙凝胶洗脱	20	780	73	40

丝氨酸羟甲基转移酶活力的测定

称取一定量的组织与 7 倍体积的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 一起匀浆。匀浆液于 40000g 离心 40 分钟, 上清液用于测定酶活力。

总体积为 2 毫升的 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8) 的保温混合液中含有: 5μM L-丝氨酸, 1μM H₄-叶酸, 1μM NADP, 0.2μM 磷酸吡哆醛, 0.2 毫升 5, 10-甲叉-H₄-叶酸脱氢酶 (比活力为 70 单位/毫升左右), 10μM 2-巯基乙醇。带有混合液的试管中加入 0.05~0.1 毫升待测组织抽提液, 使反应开始, 并在 37°C 使反应进行 5~10 分钟。加入 1 毫升 45% HClO₄ 使反应停止。对照组中在加入组织抽提液到混合液后立刻用 HClO₄ 溶液加以固定。当

反应停止后 15 分钟，离心分离沉淀，上清液中所形成的 5, 10-次甲基叶酸的含量可在波长 355 nm 下测定其光密度来确定。

在标准条件下 1 分钟内能形成 1 nM 5, 10-甲川-H₄-叶酸的酶蛋白量定为丝氨酸羟甲基转移酶的一个活力单位 (U)。酶的比活力以每毫克蛋白质或每克组织的单位数表示。试样中的蛋白质含量用 Lowry 法测定。研究小鼠及大鼠肝脏组织中酶活力的测定条件时我们发现：反应终产物形成的速度与加入的酶蛋白的量(在 0.5~1.5 毫克范围内)与保温时间(在 5~10 分钟范围内)是成正比的。保持上述测定条件时此方法的误差在 ±4% 范围内。

用上述方法测定非品种小鼠及大鼠肝脏组织中的丝氨酸羟甲基转移酶活力各为 16±1.14 单位/克及 14.6±0.98 单位/克。小鼠肝脏亚细胞结构中酶的比活力在核中为 5.2 单位/毫克，在线粒体中—21 单位/毫克，在微粒体中—4.8 单位/毫克。

方法的应用

这个方法可用于哺乳类及人体各种组织中丝氨酸羟甲基转移酶活力的测定。由于只需 5~10 毫克组织就可用来测定酶的活力，所以此法可用于临床以测定活体检查时少量组织中以及血液的有形成分中的丝氨酸羟甲基转移酶活力的测定。

尿及血清中精氨酸含量的测定方法

Л. П. Алексеевко

世界文献中记载过在血液、脑脊液及尿中同时出现高精氨酸遗传病的病例(Peralta, 1965)。这种病与先天性的精氨酸不足有关。在同型合子携带者中进展尤为严重。由于这种病伴有大量精氨酸血症，所以可以根据实验分析资料进行诊断。用层析法测定

精氨酸需要很昂贵的设备，或者需要一系列繁重的操作（尿的浓缩、脱盐等等）。对精氨酸专一的颜色反应（Sakaguchi 反应或坂口反应）又不能直接使尿中的精氨酸显色，因为尿素干扰有色反应产物的生成。

为了测定尿中及血清中精氨酸的含量，我们设计了一个很简便的但专一性很高的微量方法，不需要预先将尿进行浓缩及脱盐。

方 法 原 理

将尿或无蛋白的血清过滤液点到层析纸上，用无水乙醇走过夜。此时，精氨酸停留在点样的原点上，而尿素及三氯乙酸被洗脱掉了。将样品用碱抽提，并按我们以前所叙述的方法（包括使呈色反应物稳定）进行坂口反应（Л. П. Алексеенко, В. Н. Орехович, 1971）。

这个方法适用于对大量病人进行高精氨酸血症的普查，它只需要极少量的尿或血清（0.1~0.2 毫升）。由于正常尿中含精氨酸很少，并且精氨酸的含量与膳食无关，所以最初的普查可以只采用尿的分析。

试 剂 及 仪 器

96% 乙醇，应与煅烧过的硫酸铜或氧化钙共煮脱水后进行蒸馏（即制备无水乙醇——译者）。

1-萘酚，用乙醇重结晶后制成 0.2% 无水乙醇溶液，贮存在深色瓶子中。

次溴酸盐，将 1 毫升溴溶于 250 毫升 1N NaOH 中（原始溶液），在冰箱中可存放 1 个月。

20% 硫二甘醇（2, 2'-二羟基二乙硫），溶于 0.25N NaOH 中。

5N KOH 及 0.25N NaOH 溶液。

精氨酸盐酸盐(化学纯,分子量 210.7); 4.4 毫克溶于 2 毫升水中(原始标准溶液)。

层析箱, 层析纸, CΦ-4 分光光度计或可以测量波长 520 nm 的光密度的 ΦЭK 光电比色计。

测定过程

在一张长 15 厘米宽 60 厘米(宽度决定于层析船的大小)的层析纸上, 横向上画出 2×2 厘米的小方块(边上留出 5 厘米)。每个方块的当中加上 0.01 毫升 5N KOH 溶液, 不要等到碱溶液蒸发干了就在 KOH 所形成的斑点上点上 0.01 毫升尿、无蛋白的血清离心液或用于作标准曲线的精氨酸标准溶液。不必将尿预先进行处理, 但应将血清中的蛋白质加等体积 10% 三氯乙酸沉淀后离心除去。

在同一个点上可以点几次待分析的样品溶液, 每次点上 0.01 毫升, 待第一次所点的样品干燥后再点第二次。然后将层析纸放到层析箱内固定于层析船上, 用无水乙醇洗脱过夜。

将纸吹干, 浸于 0.05% 1-萘酚的无水乙醇溶液中(此溶液在使用前直接从 0.2% 的原始溶液配制)。将滤纸再次吹干至完全除去乙醇。剪下带有样品的方块, 将它剪碎放入试管中(最好直径为 18~20 mm 的试管)。不应将层析纸剪得太碎, 因为用碱抽提时会把纸泡得过胀。每个试管中加入 3 毫升碱液, 振荡后再加入 0.4 毫升次溴酸盐(在使用前用 0.25 N NaOH 将原始溶液稀释 10 倍配制而成), 立刻显出玫瑰红色。加入次溴酸盐并加以剧烈振荡 20~30 分钟后, 将 0.2 毫升 20% 硫二甘醇(0.25 N NaOH 溶液)加入试样中, 再将试样加以振荡, 在波长 520 nm 下测定光密度, 以对照组作空白。对照组是不点有样品只有碱液的方块纸的抽提液。

应用标准曲线将 520 nm 的光密度值换算成样品中精氨酸的

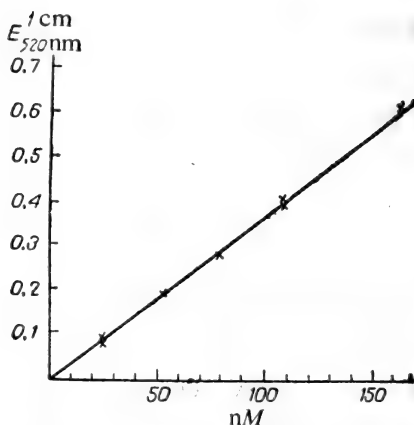


图 5 测定精氨酸浓度的标准曲线。样品的最终体积为 3.6 毫升
纵座标——520 nm 的光密度；横座标——点于层析纸上的精氨酸量 (nM)

nM 数，再进一步计算出所测的材料中精氨酸的浓度。图 5 中所列的标准曲线是用标准精氨酸溶液作不同的稀释后而制作的。稀释范围在 27~165 nM 内 (4.7~28.7 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)。每个稀释度作 5 个平行测定。

建立这个方法时应注意：

1. 用乙醇洗脱层析图谱时，溶于无水乙醇中的尿素被同一溶剂带走，不溶解的精氨酸仍被吸附在纸的原点上。但是，如果样品中有三氯乙酸，由于它能与精氨酸形成盐类化合物，所以用乙醇洗涤后在原点附近除了主要是精氨酸斑点外，还形成第二个斑点，它也含有精氨酸，走在三氯乙酸之后面。在此条件下三氯乙酸的 R_f 值为 0.77，而第二个精氨酸斑点的 R_f 值为 0.53。为了避免这种情况，我们建议在点样之前先用 5N KOH 将层析纸上点样处先行湿润，点上 0.01 毫升 KOH 后，就可以陆续点上 0.05~0.06 毫升甚至更多的待测溶液，但是操作时应使样品溶液的斑点的外缘不超出碱的斑点的外缘。按这样操作时，在乙醇洗涤后，精氨酸

仍停留在起点上,并且为致密的斑点,而碱的斑点的外缘可沿纸的纵向被洗去。

2. 正常尿中除了极微量的精氨酸外还有较多的其它物质,也能在坂口反应时生成颜色,例如胍基乙酸。在用乙醇洗涤一夜后,

表 13 不同实验条件下精氨酸含量测定结果的重复性

所测试样的成分	精氨酸含量($nM/10\mu l$)		
	点到纸上的量	测得的量 $M \pm m$ (测定的数目)	测得的与加入的精氨酸量的比例(%)
精氨酸的水溶液	171	$175 \pm 0.9(6)$	102
	171	$171 \pm 0.5(6)$	100
	160	$154 \pm 0.5(5)$	96
	110	$107 \pm 0.5(6)$	97
	55	60 (6)	109
精氨酸溶液, 2%	160	$157 \pm 1.0(5)$	98
血清清蛋白溶液, 2.5%	110	$107 \pm 0.3(4)$	97
三氯乙酸溶液(沉淀蛋白质后的离心液)	55	58 (6)	105
人血清, 精氨酸溶液, 6% 三氯乙酸溶液(沉淀蛋白质后的离心液)	300	$282 \pm 0.6(5)$	94
	300	$282 \pm 0.6(6)$	94
	300	$285 \pm 0.5(6)$	95
	300	$285 \pm 0.7(5)$	95
	300	$290 \pm 0.7(6)$	97
精氨酸的尿溶液	250	$234 \pm 0.4(4)$	94
	200	$190 \pm 0.4(5)$	95
	153	$153 \pm 0.3(5)$	100
	100	$103 \pm 0.2(5)$	103
	50	50 (3)	100

胍基乙酸就与精氨酸分开,所以不至于干扰精氨酸的进一步测定。

3. 点样后的滤纸尽可能不要放在光亮处,因为在光照下,精氨酸会被破坏。滤纸用 0.05% 1-萘酚处理后应立刻吹干,除去全部乙醇,剪碎进行抽提和坂口反应。

表 13 中引用了在水溶液中及尿中(加精氨酸)的精氨酸以及在血清清蛋白溶液或血清中沉淀除去蛋白质后的三氯乙酸离心液中精氨酸测定结果的重复性的资料。所列资料用变差统计(Вариационная статистика)法加以处理,是 5~6 个平行试验的平均值。所测得的精氨酸含量为加入的精氨酸量的 95~100%。

正常尿中及健康人的血浆中精氨酸的含量极少。根据 Stein (1953), Stein 及 Moor (1954)的资料,昼夜尿中(1.5~2.0 升)含精氨酸 10~20 毫克,而在血浆中为每 100 毫升含精氨酸 1.5 毫克。但是在精氨酸酶不足而有先天性尿素形成缺陷的病人中,尿中精氨酸的含量比正常人增高 250~300 倍,而在血浆中比正常人高 10 倍。

生物体液及组织中 pH , pNa^+ , pK^+ 的动力学研究

Е. А. Юматов

由于离子谱及微电极技术的发展,对生物体液及组织中的氢离子,钠离子,钾离子及其它离子的活度的动力学测定有了可能。

离子谱是借助于阳离子选择性电极,直接地连续地不破坏代谢过程不损伤组织地对生物结构中的离子活度进行测量和自动记录的一种电位测量法。

研究生物体系中的阳离子时,发现离子谱比起比色法、光度法及其它分析法来有一系列的无法比拟的优越性。它的最大优点在

于：可以在不破坏组织的情况下在体内或在原位(in situ)高灵敏度地测量 H^+ 及碱性阳离子 K^+ 、 Na^+ 的离子活度。这种方法的另一个重要优点是：它可对离子活度进行动力学测量。连续的测量使有可能对所研究的过程中的一系列阶段进行观察，而在不连续的测量中要做到这一点是不可能的。电极所反映的并不是阳离子的浓度而是阳离子的活度，这也是这种方法的一个优点。电极对氧化还原电势不敏感，电子的传递及氧电势不影响它的读数。介质中有蛋白质存在也不会对离子谱起有害的作用。

电极适合于在胶体系统中工作，调换方便，不需要定期的清洗，具有足够的稳定性，具有结果的重复性并带有瞬时读数装置。

方法的原理及理论前提

这个方法的根据是：由特种玻璃制成的电极上所产生的电势，其数值的大小与周围介质中一定种类的离子的活度有关。

目前已经制成了选择性地对氢离子，钠离子及钾离子敏感的玻璃，也已研制出了用于两价阳离子及两价阴离子的玻璃。

由 Б. П. Никольский(1937~1958)和他的学生(Б. П. Никольский и др., 1958)以及 Эйзенман(1964)所建立起来的阳离子选择性电极理论可确定电势强度与离子活度之间的关系，以及使有可能提出了《玻璃作用(Функции стекла)》机理，这就建立了研制新成分的玻璃的前提。玻璃电极的电势值(E)可用下列公式表示：

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln(a_H + K_{H/Na} \times a_{Na})$$

$$a_e = (a_H + K_{H/Na} \times a_{Na})$$

式中 R , T , F , n 为大家所共同采用的符号； a_e 为玻璃膜外离子的活度； E_0 ——取决于玻璃成分及电极内电介质活度的标准电势；当

$a_{\text{H}} + K_{\text{H/Na}} = 1$ 时, $E = E_0$, 这个公式描述了与 Na^+ , H^+ 两种离子的活度有关的电势。玻璃的选择性程度由 $K_{\text{H/Na}}$ 值决定, $K_{\text{H/Na}}$ 值为离子交换反应平衡常数, 它与玻璃成分有关并以在玻璃及平衡溶液中可交换的离子键的强度的差异为特征。 $K_{\text{H/Na}}$ ——可按离子交换反应的质量作用定律计算。对于氢玻璃来说 $K_{\text{H/Na}}$ 为 $10^{-12} \sim 10^{-15}$, 所以与钠离子有关的电势是很小的, 因此电极选择性地对氢离子敏感。

描述对钠离子或钾离子敏感的电极的电势的公式可以写成:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln(a_{\text{Na}} + K_{\text{Na/K}} \times a_{\text{K}})$$

式中 a_{Na} , a_{K} ——溶液中相应的离子的活度。当 $K_{\text{Na/K}} < 1$ 时, 电极对 Na^+ 离子具有专一性; 而当 $K_{\text{Na/K}} > 1$ 时, 电极对 K^+ 离子具有专一性。对钠离子敏感的电极来说已达到了很高的选择性—— $K_{\text{Na/K}}$ 约为 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 。对钾离子敏感的电极具有较低的选择性, $K_{\text{Na/K}}$ 为 $4 \sim 10$, 这就不能将它用于钠含量很高的介质中。电极函数(Электродная функция)的斜率是以改变 1 个 pH, pNa^+ , pK 单位时电势的位移来表示的。 $\frac{RT}{nF}$ 的斜率在 20°C 时为 58 mV 。

玻璃电极的钠和钾的功能(Функция)与氢离子浓度有关。但是, 这些电极对氢离子的实际敏感度只有在极限值的 pH 值下才会表现出来。介质的 pH 值在 $2 \sim 12$ 时, 实际上不影响对钠离子敏感的电极的读数。所以, 用适当的电极来测量生物体中的 pNa^+ , pK^+ 值时, 实际上不需要对 pH 值加以校正。

用电极测量反应溶液中相应离子活度的电势就是将它与另一个电势值恒定的电极进行比较。常用甘汞电极或氯化银电极作为参考电极, 这些参考电极都具有能使自己维持恒定的电势的能力。

在电极电路中除了与离子的活度有函数关系的电势以外还存

在许多额外的电势, 这些额外电势的漂移可以掩盖所测得的电势的真实意义, 所以电极电路的建立要考虑到所有存在于电路中的外来电势的最大可能的稳定作用, 这些外来电势是液体电势、扩散电势、不对称电势。为了达到这一目的应在外部参考电极上引入一根直径为 1~5 毫米的, 装有用林格尔(Рингер)溶液配制的琼脂的聚乙烯管子。

在不可能排除旁路电势的影响时(例如在测量 pH , pNa^+ 或 pK^+ 的真实值时脑组织的生物电活动的电势的影响)就必须控制这些电势的漂移。为此, 可采用一对附加电极, 在这对电极中不用阳离子选择电极而采用外部参考电极。

阳离子选择电极的读数与温度有关。因此使待测底物的温度保持稳定是很重要的。有可能的话应对温度加以校正。这种校正已设计在 pH 计的线路中。如果在仪器中设有所用电极的等电势点的座标的话, 那么温度的补偿是可能的。但是与温度的改变有关的测量误差是很小的, 平均为每 1°C $0.5\sim 0.7\text{mV}$, 即每 1°C 还不到 0.01pH 。根据 Portnoy 等(1963)的资料, 与血流的改变有关的温度变化不超过 0.5°C , 所以对阳离子选择电极的读数没有实质性的影响。

电 极

生物学研究中采用了各种类型的电极。选用哪一种电极取决于实验的性质。球形电极及膜电极用于测量组织或器官表面以及液体中的离子活度。流动电极常用于测量流动的液体如血液中离子的活度。矛形电极用于组织内离子活度的测量。

电极的外壳是由高欧姆玻璃(具有高欧姆电阻的玻璃)制成。外壳上涂有一层用选择性玻璃制成的玻璃膜。电极内部装有标准电解质溶液。装有电解质 $\text{Ag}/\text{Ag}-\text{Cl}$ 的电极作为内部参考电极。电

极外部加以密封。电极的电阻不应低于 10^9 欧姆。电极内电解质的离子活度应保持稳定。用这些电极所测得的电势只与电极周围的介质的离子活度有关。

玻璃电极在使用前应放在与电极内电解质相同的溶液中浸泡一昼夜, 如 pH-电极浸于 0.1 N HCl 中, pNa^+ -电极浸于 0.1 N NaCl 中。这样做是为了使玻璃的专一性作用稳定, 使它的选择性程度提高, 也可使不对称电势稳定。不对称电势发生于玻璃膜的表面, 它是由于电极的内表面与外表面的不同曲率半径所引起的。当电极浸于与电极内相同的溶液中时可以测定不对称电势的大小。在实验间歇中, 或者将电极保存在这样的溶液中, 或者保存在这种溶液的蒸气中。

为了动态的测量少量液体中或组织表面的离子活度, 可以采用膜电极。这种电极的制作包括几个步骤: (1) 将直径为 3 mm 的高电阻玻璃 BA-1 制成的玻璃毛细管截成长为 $4\sim 6$ 厘米的小段; (2) 将毛细管一端的横截面磨光, 将另一端在火焰上烧熔后把内径扩大; (3) 用阳离子选择性玻璃吹成一个薄壁的球; (4) 将毛细管的磨光的一端烧热, 割下选择性膜小球, 把它接到毛细管上, 同时把它做成平底状; (5) 用一根小吸量管将电解质装满电极, 表面涂上一层凡士林以防止电解质蒸发, 以装于电极内的电解质中的氯化银丝作为内部参考电极。将电极浸泡于与电极内相同的电解质中。再根据电极函数的斜率、读数的稳定性和重复性进行选择。

近年来阳离子选择性微电极在生物学及生理学研究中已广为普及。这种电极对于测量活组织中甚至离体细胞的细胞质中的阳离子活度特别方便。Caldwell (1954, 1958) 首先将这种电极做成 pH-微电极的形式。从此以后便制造出了各种选择性微电极结构。在这些微电极的结构中感受端的直径大大缩小——从 $150\text{ }\mu\text{m}$ 缩小到 $50\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ 甚至缩小到 $1\sim 2\text{ }\mu\text{m}$ 。

离子活度的电势测定的微电极法

测量 pH 及其它离子的电势的微电极法的优点是：选择性的微电极可以尽可能的在生理条件下局部地研究处于动态中的离子活度，而对生物组织无实质性的损伤，还能同时测量其它指标。

为了进行稳定的测定，pH 微电极的一端应该有面积恒定的感受表面，它的电阻应低于电极其它部分的电阻。为了防止分路电势，微电极的尖端应该封住。微电极结构上的差异主要是在于电极的非感受部分的绝缘方式不同。但是，如果说在制作极小的感受尖端 ($1\sim 2\mu\text{m}$) 的选择性电极方面已取得一定成就的话，那么在制作可靠而又简单的绝缘方面还未获成功。

我们所制作的 pH, pNa^+ 及 pK^+ 微电极 (图 6) 是一个带有直径为 $5\sim 50\mu\text{m}$ 的尖头的，长度为 $10\sim 15\mu\text{m}$ 的感受部分的微量吸量管。除了尖端外，全部选择性微量吸量管采用 Khuri 等 (1967) 的改良法加以绝缘。制作微电极的方法如下：用阳离子选择性玻璃的毛细管拉成一根微量吸量管，将它的末端放入适当的电解质中以便使电解质溶液进入微量吸量管中，然后将微量吸量管的尖端封闭，电极中多余部分的电解质液柱在 $\Phi_{\text{OH6-pH}}$ 型微形煅炉上把它挨近电炉丝而蒸发掉。从微量吸量管钝头一端用注

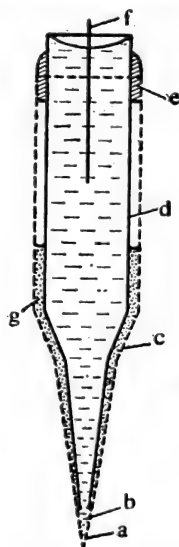


图 6 阳离子选择性电极的结构

a——感受尖端；b——电极内电解质；c——用阳离子选择性玻璃制成的微量吸管；d——由硼硅酸玻璃制成的微量吸管；e——云杉素；f—— Ag/AgCl 电极；g——凡士林

射器注入凡士林，然后沿吸量管末端在烧热的电炉丝上来回移动使在电解质表面上形成紧密的油膜。然后，着手安装内部的更为细小的硼硅酸玻璃微电极（微电极先用同样电解质灌满）。在显微镜下通过移动硼硅酸玻璃微量吸量管通过凡士林层直至它的开口的末端浸入电解质液柱中。带有钝末端的两个吸量管都用融化的云杉素将它们彼此固定住。因此，电极的工作部分是从内部与电解质液柱相接触的表面，而电势的消除是靠内部的硼硅酸玻璃微量吸量管来实现的。凡士林层使微电极的非工作表面获得可靠的绝缘。将制作好的微电极在适当的电解质溶液中泡一昼夜，然后贮存于此电解质中。可用缓冲液来选择并校正电极。假如电极函数的曲率为每单位 pH , pNa^+ , pK^+ (20°C 时) $58\sim 56\text{ mV}$ ，漂移每小时不超过 0.02 pH 的话，这个电极就是合格的。

用氯化银电极作阳离子选择性微电极的内部参考电极。将电极对插入生物组织（如脑组织）使其阳离子选择性微电极的尖端位于组织中，而琼脂电解质开关位于距微电极不远的组织表面上。将旁路电势与反映离子活度变化的电势一起加以调节。为了测量 pH , pNa^+ , pK^+ 的真实值，必须控制旁路电势的漂移。为了达到这一目的，应采用与 pH 计的输入相联的电极对，在电极对中用硼硅酸玻璃微电极代替阳离子选择性微电极。用于记录对照电势的电极对的布置一般与测量脑组织 pH 的电极的布置相似。

旁路电势漂移的控制可以通过同步地或相继地测量离子活度来实现。第一个方法更为方便，因为在这种情况下可以得到自动的校正，即在事先更换一个电极并从测定对照电势及离子活度的 pH 计的输出端把信号传送到记录仪的输入端的情况下，旁路电势就可以得到自动校正。由于某种原因不便于同步记录时，也可以在与测量 pH , pNa^+ , pK^+ 相同的实验条件下，在另一个单独的实验中测量对照电势。如果这时发现有对照电势变动的話，就应当

将它从 pH , pNa^+ , pK^+ 值中减去。

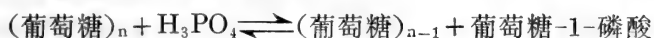
可以用 ЛПИУ-01 型 pH 计进行 pH 的动力学测定。可在这种 pH 计的线路中作一些改变, 使它在生理 pH 范围内把标尺放大, 使标尺上的一个刻度相当于 0.01 pH 。上述方法可对 pH 进行动力学测定和对生物介质及生物组织中的其它离子的活度进行测定, 其正确性可达到小数点后两位。

在生物化学研究领域内对生物介质的 H^+ , Na^+ 及 K^+ 的离子活度进行动力学测量可用来解决一系列的问题, 这些问题包括少量蛋白质溶液的滴定, 某些酶活力的测定(乙酰胆碱脂酶等), 线粒体及其它细胞内结构的悬浮液中离子过程的研究。

糖原磷酸化酶活力的测定

Е. В. Раменский

糖原磷酸化酶(1, 4-D- α -葡聚糖: 正磷酸- α -葡萄糖苷转移酶 (EC 2.4.1.1)按下式催化糖原的磷酸化:



磷酸化反应是可逆的。但是在体内糖原磷酸化酶只催化糖原的分解, 因为形成的葡萄糖-1-磷酸由于不断地进入糖解酶类的作用圈而从反应液中消失。

可用不同的方法测定糖原磷酸化酶的活力。根据无机磷酸与葡萄糖-1-磷酸 pK_a 不同的 pH 滴定法 (Метод pH статирования) 可以用来研究从无机磷到葡萄糖-1-磷酸的转变, 也可用来研究它的逆反应 (Palter, Lukton, 1973)。这个方法对测定高浓度的纯酶特别适用。

糖原磷酸化酶活力测定法是根据磷酸葡萄糖变位酶及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶两个酶同时存在下对糖原磷酸化直接反应速度

的测量(Helmreich, Cori, 1964)。第一个酶催化葡萄糖-1-磷酸到葡萄糖-6-磷酸的异构化作用, 第二个酶参与有 NADP 存在下的底物的氧化作用, NADP 转变成还原型 NADP·H, NADP·H 的量可用分光光度法测定。

但是大多数测定糖原磷酸化酶的方法是利用了它的可逆反应——在此酶作用下合成糖原。经典的 Cori 法 (Illingworth, Cori, 1953)就属于这一类。这个方法为下面要叙述的方法奠定了基础。已有人提出了 Cori 法的改良法。在改良法中, 当有高浓度葡萄糖-1-磷酸存在时酶促反应遵守动力学的零级反应(Hedrick, Fischer, 1965)。以后, 又研制出了这个方法的自动化测定方案(Haschke, Heilmeyer, 1972)。也可用差示偏振光谱法测定磷酸解酶的活力(Mason, Fasella, 1971)。下面所述的测定糖原磷酸化酶活力的方法是以标记 ^{14}C -葡萄糖-1-磷酸中的 ^{14}C -葡萄糖掺入糖原中的作用为基础的(Wang, Esmann, 1972)。用乙醇沉淀糖原, 在滤纸上过滤分离, 然后测量其放射性强度。

方 法 原 理

在 Cori 法中测定的是糖原由于磷酸化反应而释放出来的无机磷。这个方法既可用于滴定酶的活性型(磷酸化酶 a), 也可用于测定酶的无活性型(磷酸化酶 b)。酶的无活性型只有在反应混合液中加入 5'-AMP 时才能表现出催化作用。将糖原、葡萄糖-1-磷酸(如果是测定磷酸化酶 b 时还要加 AMP) 加于含有酶的反应液中(酶溶于磷酸缓冲液)。经过一定时间后取样用 Fiske-Subbarow 法测定其中的无机磷含量(Умбрейт и др., 1951)。释放出来的无机磷在强酸存在下与钼酸铵形成黄色的盐 $(\text{NH}_4)_3\text{H}_4[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$ 。磷钼酸铵进一步在氨基萘酚磺酸钠(1-氨基-2-萘酚磺酸钠盐)存在下被还原至亮蓝色产物, 后者的浓度可用分光光度法测定。

试剂和仪器

500 毫升 40 mM 2-磷酸甘油-30 mM 半胱氨酸溶液 (pH 6.0 或 6.8)。

5 毫升 4% 糖原溶液。

5 毫升 64 mM 葡萄糖-1-磷酸溶液, 酸化至 pH 6.0 或 6.8。用于测定磷酸化酶 b 的活力时, 此溶液中还应加入 4 mM AMP, 1 升 0.0735 N H_2SO_4 溶液。

200 毫升 2.5% 钼酸铵的 5 N H_2SO_4 溶液。将钼酸铵先溶于水, 然后加入适量的浓硫酸。

0.25% 氨基萘酚磺酸钠溶液 (溶于含有 0.625% Na_2SO_3 的 14.6% NaHSO_3 中)。将 0.5 克化学纯氨基萘酚磺酸钠溶于 195 毫升化学纯 15% NaHSO_3 中, 然后加入 5 毫升 25% Na_2SO_3 溶液。溶液存放于暗色容器中, 放于冷处。

下面推荐一个纯化强显色剂氨基萘酚磺酸钠的方法: 将 15 克氨基萘酚磺酸钠溶解于 1 升水中, 加热至 90°C , 加入 150 克 NaHSO_3 及 10 克 Na_2SO_3 。将溶液冷却后过滤。滤液中加入 10 毫升浓 HCl , 生成的沉淀离心分离, 并用水洗涤然后再用乙醇洗涤, 在烘箱中 (暗处) 烘干。将烘干至乙醇气味消失的制剂贮存于暗处。

带有玻璃电极的电位计, 超级恒温水浴, 分光光度计 (如 CФ-4A) 或光电比色计, 台式离心机 (8000~10000 转/分钟, 可达到 6000g)。

测定过程

在 0.4 毫升酶溶液 (溶于含有 40 mM 2-磷酸甘油及 30 mM 半胱氨酸的缓冲液中, pH 6.0 或 6.8) 中加入 0.2 毫升 4% 糖原溶液,

30°C保温 2~3 分钟。同时在同一个恒温水浴中将葡萄糖-1-磷酸或含 AMP 的葡萄糖-1-磷酸溶液加热。在试样中加入 0.2 毫升葡萄糖-1-磷酸或 0.2 毫升含 AMP 的葡萄糖-1-磷酸, 使反应开始。反应混合液成分的最终浓度为: 15 mM 半胱氨酸, 20 mM 2-磷酸甘油, 1% 糖原, 16 mM 葡萄糖-1-磷酸, 1 mM AMP。每隔 5, 10, 15 分钟从反应混合液中取出 0.2 毫升试样并用 Fiske-Subbarow 法测定无机磷含量(Умбрейт и др., 1951)。为此, 将 0.2 毫升试样与 3.8 毫升 0.0735 N H_2SO_4 相混合使其酸化以终止酶反应。将样品迅即转移到冰浴中, 加 0.8 毫升钼酸铵溶液, 仔细搅拌并在 37°C 保温 5 分钟, 酸的最终浓度必须接近于 1 N。将反应液重新冷却, 在波长 720 nm, 1 厘米的光径的比色杯中进行比色测定。当酶的浓度选择得当时, 测得的光密度值不会超出仪器标尺工作区域的范围, 并且在光密度——保温时间图中构成一条直线。

标准曲线的制作

测定糖原磷酸化酶制剂的比活力时必须测定转变成无机磷(Pi)的葡萄糖-1-磷酸的量。为此, 预先准备已知浓度的无机磷溶液并作一系列的稀释。由氨基萘酚磺酸钠氧化而形成的有色产物溶液的光密度应当落在测量仪器的标尺工作范围以内。

将 5.7 毫克 $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 溶于 5 毫升水中, 这一重量相当于 5.95 毫克磷, 即 15 μM 的葡萄糖-1-磷酸二钾盐($C_6H_{11}O_6PK_2 \cdot 2H_2O$)。制备磷含量比上述《试剂》一节中所说的 64 mM 的原始葡萄糖-1-磷酸溶液要稀 20 倍的溶液。将所得溶液稀释 1.5, 2, 2.5, 5, 10 倍。从制备好的已经稀释的磷酸钠中各取样 0.2 毫升, 与 0.6 毫升水相混合, 再取出 0.2 毫升样品按《测定过程》一节所述操作作用 Fiske-Subbarow 法测定磷含量, 制作光密度 E_{720nm} -反应液中磷浓度的标准曲线(图 7)。

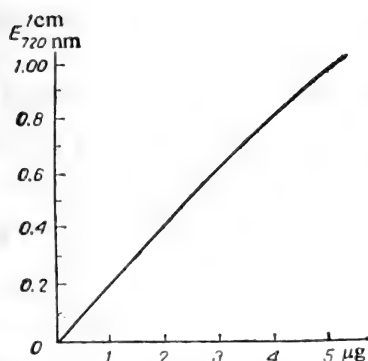


图 7 定磷标准曲线。当葡萄糖-1-磷酸 100% 分解时，
反应液中有 103 μg 的磷

纵座标——波长 720 nm 的光密度；横座标——样品中的磷含量（微克）

糖原磷酸化酶活力的表示法

在上述条件下在很宽的稀释范围内反应的速度都与酶浓度成正比。

$$k = \frac{1}{t} \lg \frac{X_e}{X_e - X}$$

式中 k ——一级反应的速度常数，其因次为分钟 $^{-1}$ ； X_e ——在达到平衡时转变成无机磷及多糖的葡萄糖-1-磷酸的百分数，以加入反应混合液中的 0.2 毫升 64 mM 的葡萄糖-1-磷酸 (103 微克) 的磷量作为 100%； X ——时间 t (分钟) 内被转变的底物的百分数； X_e ——与介质的 pH 有关，在上述条件下并在 pH 6.8 时 $X_e = 78$ ，在 pH 6.0 时， $X_e = 86$ 。在 pH 为 6.8 时，反应速度达到最大值，在 pH 6.0 时反应速度要低 30%。

我们引用测定兔骨骼肌磷酸化酶 b 制剂的比活力的资料：在 pH 6.0 时，保温 10 分钟后，反应混合液的 E_{720} 达到 0.790。所以 (见图 7) 酶已将 3.9% 的葡萄糖-1-磷酸转变成了无机磷。计算：

$$k = \frac{1}{10} \lg \frac{86}{86 - 3.9} = 0.1 \lg 1.05 = 0.0021 \text{ 分钟}^{-1}$$

为了方便起见将 k 乘以 1000 就得到反应液中糖原磷酸化酶活力单位的总值, $0.0021 \times 1000 = 2.1$ 单位。为了计算所分析的 1 毫升的溶液中酶的活力单位数, 应将此结果乘以 10。由于在我们的实验中酶的原始溶液已经稀释了 400 倍, 所以在酶的原始溶液中糖原磷酸化酶的活力应为 8400 单位/毫升。为了计算酶的比活力, 用一般常用的方法测定原始溶液中的蛋白质浓度, 并将每毫升中酶的单位数除以蛋白质浓度(毫克/毫升)。我们所用的蛋白质浓度是每毫升 7 毫克, 所以, 糖原磷酸化酶制剂的比活力为 $8400 \div 7 = 1200$ 单位/毫克。在不是最适 pH 值(pH 6.0)的情况下, 给以 30% 的校正, 于是得到的将是 1560 单位/毫克, 而不是 1200 单位/毫克。在 pH 6.8 时测得的兔骨骼肌结晶磷酸化酶 a 及 b 的比活力各为 2200 及 1600 单位/毫克蛋白质(Hedrick, Fischer, 1965)。

测定组织或细胞的提取液中以及未经纯化的制剂中糖原磷酸化酶的活力时, 要对 Cori 的方法作如下的修改。为了将磷酸葡萄糖变位酶及磷酸酶的作用降到最低, 将反应混合液酸化到 pH 6.0~6.3, 并再加入 NaF 到最终浓度为 10 mM, 加 EDTA 到 0.5 mM, 加冷的三氯乙酸(不是加无机酸)至最终浓度 5%, 以停止反应。离心除去沉淀出来的蛋白质。用上述方法测定上清液中的无机磷。

用葡聚糖凝胶(Sephadex)亲和层析从人体及动物组织中分离酸性 α -葡萄糖苷酶(γ -淀粉酶)的方法

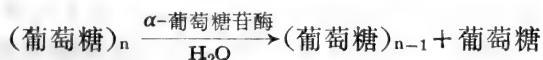
Д. М. Беленький

酸性 α -葡萄糖苷酶(γ -淀粉酶, EC 3.2.1.3)催化麦芽糖、异

麦芽糖及其母体均聚同系物——糖原、葡聚糖等中的 α -1, 4- 及 α -1, 6-糖苷键的水解。由酸性 α -葡萄糖苷酶作用的结果形成的唯一低分子产物是葡萄糖。葡萄糖是从寡糖及多糖分子的非还原端被分解下来的。位于溶酶体中的酸性 α -葡萄糖苷酶是这些细胞器中能将糖原完全分解的唯一的酶。酸性 α -葡萄糖苷酶不足会导致严重的遗传病——II 型糖原过多症或 Pompe 氏症 (Hers, 1963), 这种疾病的特征是在人的肝脏、心脏及骨骼肌细胞中糖原的积累。应用从动物组织, 特别是从人的组织中分离出来的高度纯化的酸性 α -葡萄糖苷酶, 可能是治疗糖原过多症的有效方法。

酸性 α -葡萄糖苷酶活力的测定

α -葡萄糖苷酶所催化的反应按下列反应式进行:



通常以麦芽糖(麦芽糖酶活力)或以糖原(葡萄糖淀粉酶活力)为底物测定酸性 α -葡萄糖苷酶的活力。测定酸性 α -葡萄糖苷酶必需要下列试剂: 经碳-硅藻土(charcoal-celit)柱纯化后的麦芽糖(Whistler, Durso, 1950)及不含有杂质的葡萄糖, 糖原, 0.1 M 乙酸缓冲液(pH 4.8), 0.3 N NaOH 溶液, 5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 葡萄糖氧化酶试剂(见 И. С. Лукомская, 116 页)。

根据麦芽糖及(或)糖原在 pH 4.8 下形成葡萄糖的速度来测定酸性 α -葡萄糖苷酶的活力。在 1 毫升保温液中含有: 0.3 毫升酶液, 2 毫克麦芽糖或 10 毫克糖原, 100 μM 乙酸缓冲液(pH 4.8)。与麦芽糖保温的时间为 10~30 分钟(37°C), 与糖原则为 30~60 分钟。反应结束后, 将 0.1 毫升保温液取出放到含有 1.1 毫升水, 0.4 毫升 0.3 N NaOH, 0.4 毫升 5% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的离心管中, 混

合物离心后，用葡萄糖氧化酶测定 1 毫升离心液中的葡萄糖含量 (И. С. Лукомская, В. К. Городецкий, 1961)。

能在 1 分钟内催化 $1\ \mu M$ 麦芽糖分解的酶量定为酸性 α -葡萄糖苷酶的一个麦芽糖酶活力单位。酸性 α -葡萄糖苷酶的比活力以每毫克蛋白质所含的麦芽糖酶活力单位数来表示。

从人肝脏纯化酸性 α -葡萄糖苷酶

酸性 α -葡萄糖苷酶的纯化法是建立在这个酶具有水解多糖 (葡聚糖) 中的 α -1, 6-糖苷键的能力的基础上的 (Е. Л. Розенфельд и др., 1959)。因为经 Sephadex 凝胶过滤时，酸性 α -葡萄糖苷酶根据其自身的分子量较小不能被洗脱下来，而与 Sephadex 凝胶形成酶-底物复合物而与葡聚糖凝胶相结合 (Bruni et al., 1969)。将所有的蛋白质都洗脱掉后，加入酶的竞争性抑制剂甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷使结合在 Sephadex 上的酸性葡萄糖苷酶释放出来。甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷可使 α -葡萄糖苷酶以较小的洗脱体积而被很快地从柱上洗脱下来 (Д. М. Бельский, Е. Л. Розенфельд, 1971)。

匀浆与抽提

将死亡后 8~12 小时内取出的人肝于 $-20^{\circ}C$ 冰冻，用绞肉机绞碎，在 2.5 倍体积冷却到 $4^{\circ}C$ 的溶液 A 中匀浆 5 分钟 (溶液 A 含有 $25\ mM\ NaCl$, $1\ mM\ EDTA$ ，并用 $1\ N\ NaOH$ 调至 $pH\ 6.7$)，在冷室进行酶的提取 (16~20 小时)。将匀浆在冷冻离心机中离心 60 分钟， $28000\ g$ 。

硫酸铵沉淀

在所得提取液中于 $4^{\circ}C$ 下慢慢地加入重结晶硫酸铵至 0.7 饱

和度(按每 100 毫升抽提液加硫酸铵 44 克计算)。冷室中放过夜, 冷冻离心(28000 g, 40 分钟)收集沉淀。将沉淀悬浮于最小体积的冷溶液 A 中, 先对蒸馏水透析, 然后对溶液 A 进行透析, 直至完全除去痕量的硫铵及葡萄糖时为止。可根据奈氏试剂及葡萄糖氧化酶试剂的负反应来分别判断透析后的酶制剂中是否有硫铵及葡萄糖存在。

浓 缩

冷冻离心(28000g, 60 分钟)除去透析后出现的蛋白质沉淀。将上清液在回旋蒸发器中于 20~22°C 进行浓缩。将浓缩后的酶液重新对溶液 A 进行透析, 并离心除去形成的沉淀。浓缩后酶液的体积不应超过层析柱中 Sephadex 凝胶总体积的 5~6%。

Sephadex G-150 柱层析

将浓缩的酶液上 Sephadex G-150 柱, 柱子预先用溶液 A 进行平衡。柱子的大小取决于原始物质数量的多少。

例如, 从 3 公斤肝脏分离酸性 α -葡萄糖苷酶时采用 6.8×100 厘米的柱子, 总体积为 3.6 升。

用溶液 A 进行洗脱, 洗脱的速度为每小时 20~30 毫升, 每一收集组分的体积为 7~10 毫升, 按 280 nm 的吸收测定各组分中蛋白质的浓度。测定各组分中麦芽糖酶活力。等到蛋白质快要 from Sephadex 柱上全部洗脱下来时(这可以用 1.5 倍的凝胶体积的溶液 A 冲洗柱子而达到), 将 50 毫升 3~4% 的甲基 α -D-吡喃葡萄糖苷(溶于溶液 A 中)加于柱上, 再用溶液 A 作进一步洗脱。加入的抑制剂可使酸性 α -葡萄糖苷酶从柱中以很尖的峰形流出。将得到的酶溶液对蒸馏水透析至完全除去甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷。将酶液在回旋蒸发器中于 20~22°C 浓缩(千万不要过热!), 然后冰

冻干燥。从 3 公斤人肝可以得到约 40 毫克纯酸性 α -葡萄糖苷酶。

表 14 中引用了一个从人肝纯化酸性 α -葡萄糖苷酶的实验结果。

表 14 从人肝脏纯化酸性 α -葡萄糖苷酶(实验例)

纯化步骤	组 分 的 鉴 定					
	体 积 (毫升)	蛋白质浓 度(毫克/ 毫升)	麦芽糖酶 活力 (单位)	比 活 力 (单位/毫 克)	纯化的 程 度	产 率 (%)
抽提液	3530	26	1136	1.23×10^{-2}	1	100
硫酸沉淀(0.7饱和度)	1540	18.5	629	2.20×10^{-2}	1.74	55
浓 缩	209	136.6	487.5	1.71×10^{-2}	1.38	43
Sephadex G-150层析	293	0.13	337.6	8.83	720	30

上述方法提供了一个制备按超离心分析及聚丙烯酰胺凝胶电泳分析为均质的纯化 α -葡萄糖苷酶制剂的方法, 这个方法的产率在 30% 左右。由于这个纯化酸性 α -葡萄糖苷酶的方法是完全建立在酶本身的特性(能切割葡聚糖中的 α -1, 6-葡萄糖苷键及被甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷竞争性地抑制的能力)的基础上的, 所以这个方法比其它方法的优点就是它的普遍适用性, 即实际上几乎能从任何生物材料制备高纯化的酶制剂。

经聚丙烯酰胺凝胶电泳后的酶制剂中酸性 α -葡萄糖苷酶(γ -淀粉酶)的麦芽糖酶活力与葡萄糖

淀粉酶活力的测定方法

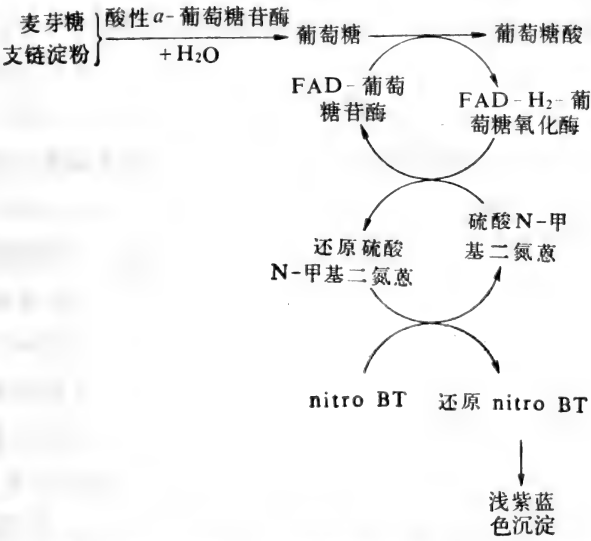
Д. М. Беленький

方 法 原 理

酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳后在板状凝胶上测定酸性 α -葡萄

糖苷酶(EC 3.2.1.3)的麦芽糖酶活力和葡萄糖淀粉酶活力的方法(Д. М. Беленький, Д. Б. Цукерман, Е. Л. Розенфельд, 1975)是 Dahlqvist, Brun (1962)用于二糖酶的组织化学显示法的改良法。这个方法是根据:当有能传递质子的染料硫酸 N-甲基二氮蒽和硝基氯四氮唑(nitro BT)存在时,从麦芽糖或支链淀粉形成葡萄糖的反应与葡萄糖氧化酶作用下葡萄糖酶促氧化反应的偶联作用。

引起不溶性有色产物(还原型 nitro BT)出现的连续反应列于图解II中。



从这个图解可见:在酸性 α -葡萄糖苷酶作用下形成的葡萄糖被特异的酶(含 FAD 的葡萄糖氧化酶)氧化至葡萄糖酸。同时,葡萄糖氧化酶本身却发生还原。被还原的 FAD·H₂-葡萄糖氧化酶进一步与硫酸 N-甲基二氮蒽的还原作用相偶联,后者又与还原型 nitro BT 偶联而被氧化,被还原的 nitro BT 是不溶性的浅紫蓝色化合物。

试 剂

不含葡萄糖杂质的麦芽糖。

支链淀粉。

葡萄糖氧化酶。

硫酸 N-甲基二氮蒽(PMS)。

硝基氯四氮唑化物 (nitro BT), 2, 2'-二对硝基-5, 5'-联苯-3, 3'-(3, 3-二甲氧基-4, 4-二苯撑)-双氯四氮唑。

0.4 M 磷酸缓冲液 (pH 6.0): 48.4 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 与 8.8 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于水中, 再加水至 1 升。

测 定 过 程

酸性 α -葡萄糖苷酶圆盘电泳, 用 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶, 在 pH 4.3 的 β -丙氨酸-乙酸盐电极缓冲液中进行 (Maypep, 1971), 电泳时间 90 分钟, 每管电流强度 4 mA。电泳后立即将聚丙烯酰胺凝胶柱从玻璃管中取出, 将一部分凝胶柱用 0.2% 考马斯亮蓝 R-250 溶液 (溶于 7% 乙酸中) 让蛋白质进行染色 (也可以用其它染料, 如氨基黑等)。应用另一部分聚丙烯酰胺凝胶柱使用接触薄膜法以显示酸性 α -葡萄糖苷酶的活力。为此, 把这部分聚丙烯酰胺凝胶放于波浪形塑料板的槽内, 用一块薄玻璃板将它复盖, 铺上一层含有麦芽糖 (用于显示麦芽糖酶活力) 或支链淀粉 (用于显示葡萄糖淀粉酶活力)、葡萄糖氧化酶及染料 PMS、nitro BT 的琼脂。

将溶液 A 与 B 按 3:1 的比例相混合以用于制备含有全部为了显示酸性 α -葡萄糖苷酶的必需成分的琼脂糖凝胶。溶液 A 的制备: 在一个恒温试管中放入 160 毫克琼脂, 40 毫克麦芽糖, 或 160 毫克支链淀粉及 6 毫升 0.4 M 磷酸缓冲液 (pH 6.0)。将此混合液

在水浴中煮沸 20~30 分钟, 使形成均一的溶液。溶液 B 的制备: 将葡萄糖氧化酶, PMS 及 nitro BT 溶于 0.4 M 磷酸缓冲液(pH 6.0)中, 2 毫升溶液 B 中含有 1.6 毫克葡萄糖氧化酶, 1.2 毫克 PMS, 3.2 毫克 nitro BT。待溶液 A 冷却至 55~60°C 后加入溶液 B, 立即将此混合液倒在水平放置的薄玻璃板上(板的面积为 6×9 厘米时, 约需要 8 毫升 A 液与 B 液的混合液)。为了更好地使琼脂凝固, 将带有琼脂层的薄玻璃板在 4°C 放 10~15 分钟。由于染料能被光氧化, 所以不应让溶液 B 及制作好的薄凝胶板长期曝光。

将含有 α -葡萄糖苷酶的聚丙烯酰胺凝胶与含有 α -葡萄糖苷酶底物的琼脂凝胶板一起在 37°C 的潮湿的保温箱内进行保温。在柠檬黄色的琼脂糖凝胶背景上出现不溶解的还原 nitro BT 淡紫蓝色条带, 说明在聚丙烯酰胺凝胶中有 α -葡萄糖酶活力存在。显色时间的长短与电泳样品中酸性 α -葡萄糖苷酶的浓度有关。例如, 高纯度的 α -葡萄糖苷酶电泳时(见 Д. М. Беленький 94 页), 保温 15~30 分钟后, 酶就被显色了, 当酶的浓度不很高时, 例如在匀浆中, 酶活力显示的时间要几个小时。为了避免由于扩散而引起的呈色区带的冲淡, 用 10% 三氯乙酸溶液喷洒在凝胶薄板上, 以使酶反应停止。将已显色的薄板, 当呈色区带出现后就立即照相, 或者在 37°C 温箱中将薄板干燥后再照相。

必须指出, 为了用上述方法显示 α -葡萄糖苷酶的葡萄糖淀粉酶活力, 不能用糖原来代替支链淀粉。由于糖原具有很大的分子量, 不能从琼脂凝胶上扩散到聚丙烯酰胺凝胶上, 所以不能被酶作用。

图 8 中引用了琼脂板照片, 照片上显示了人肝酸性 α -葡萄糖苷酶均一制剂的麦芽糖酶活力(A)及葡萄糖淀粉酶(C)活力。(A)与(C)两块薄板之间的照片(B)是用 0.2% 考马斯亮蓝 R-250 对

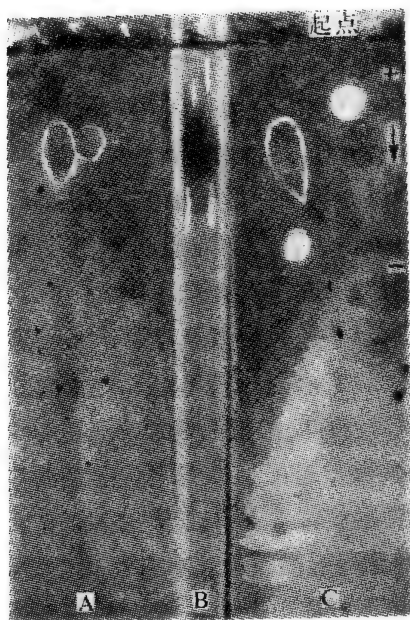


图 8 酸性 α -葡萄糖苷酶的圆盘电泳

B——用考马斯亮蓝 R-250 对蛋白质染色后的凝胶；A——酸性 α -葡萄糖苷酶的麦芽糖酶活力；C——酸性 α -葡萄糖苷酶的葡萄糖淀粉酶活力(显色法见正文)

蛋白质染色后的聚丙烯酰胺凝胶柱的照片。

上述将酶制剂电泳后再测定酸性 α -葡萄糖苷酶的活力的方法既可用于证明所提取的 α -葡萄糖苷酶制剂的均一性，也可用于分析人及动物的各种组织及器官中的酸性 α -葡萄糖苷酶的同功酶的组成。

大概，这个方法可以用于显示任何可以形成葡萄糖的酶的活力，例如葡萄糖苷酶，葡萄糖-1-磷酸酶及葡萄糖-6-磷酸酶。

游离的及结合的 6-脱氧己糖的测定方法

Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба

6-脱氧己糖广泛分布于各种天然化合物的成分中，所以弄清它们的特异性作用及生物学活性是很有意义的。已经证明，一系列血型物质的抗原特异性是由 L-岩藻糖决定的，只要从血型物质中除去岩藻糖就会完全改变它的特异性 (Г. Я. Видершайн, 1968)。

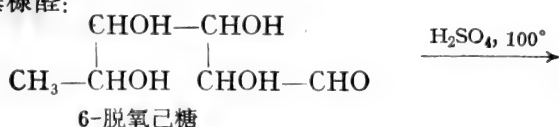
弄清 6-脱氧糖类的代谢途径不仅具有理论上的意义，在认识某些人类遗传病的机理方面也有很大的实践意义。例如，岩藻糖过多症的特征是组织中有岩藻糖糖蛋白及糖脂的积累 (Van Hoof, Hers, 1968)。

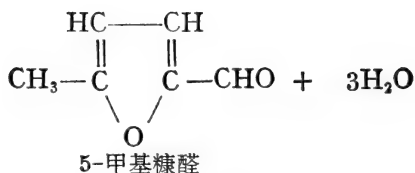
为了研究 6-脱氧糖类的酶促转变及评价它们在各种化合物中的作用需要有十分可靠的测定方法。前不久，测定 6-脱氧己糖的主要方法还是 Dische 及 Shettles (1948) 提出的方法。这个方法可以测定游离的及结合的 (与其它化合物结合) 6-脱氧己糖的总含量。近几年来文献中出现了只测定游离的 6-脱氧己糖的某些新方法。

游离的及结合的 6-脱氧己糖总含量的测定法

(Dische, Shettles, 1948)

方法原理 在沸水浴中在硫酸作用下 6-脱氧己糖脱水而形成 5-甲基糠醛：





5-甲基糠醛与半胱氨酸盐酸盐相结合,生成在波长 396 nm 有最大吸收的生色团。

试剂 H_2SO_4 与 H_2O 的混合液 (6 体积浓 H_2SO_4 加 1 体积 H_2O)。

半胱氨酸试剂——3 克半胱氨酸盐酸盐溶于 100 毫升水中。

测定过程 在冰浴中冷却的试样(体积 1 毫升)中加入 4.5 毫升硫酸与水的混合液。将试样在冷处仔细搅拌后在沸水浴中加热 3 分钟。然后将试样冷却。在搅拌下,每个试样中加入 0.1 毫升半胱氨酸试剂。为了测定半胱氨酸试剂的非特异性吸收,采用了对照试验,即在试样中不含岩藻糖,但含有其它全部反应成分。在加入半胱氨酸试剂 1.5~2 小时后将试样用 CФ-4A 分光光度计在波长 396 及 430 nm 进行测定,以对照试验作为空白。波长 396 及 430 nm 的光密度之差值(见《方法的特异性》)即为试样中岩藻糖的含量。根据标准曲线算出样品中 6-脱氧己糖的含量。

标准曲线的制作 制备每毫升水中含有 50 微克岩藻糖或鼠李糖的标准溶液。在一系列试管中分别加入 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及 0.6 毫升标准溶液,分别相当于含有 6, 10, 15, 20 及 30 微克 6-脱氧己糖。用水将每个试管补足至 1 毫升,按上述操作过程进行反应。制作波长 396nm(比色杯光径 1 厘米)吸收值——6-脱氧己糖含量(微克)的标准曲线。

方法的特异性 应用浓硫酸(86% 体积百分比)可以测定各种碳水化合物组分中甲基戊糖的含量而不必事先水解。但是,如果在待测的试样中有多糖、糖蛋白及糖脂存在的话,则在混合液中将

会出现各种不同的糖类: 戊糖、己糖胺、己糖醛酸。这些物质, 好象 6-脱氧己糖那样都能形成糠醛, 当加入半胱氨酸时生成有色产物。所以这个方法所遇到的主要困难是: 要在有其它糖类存在时测定 6-脱氧己糖的特异吸收。己糖在硫酸作用下能形成 5-羟甲基糠醛, 后者与半胱氨酸盐酸盐缩合时生成在 415nm 处有最大吸收的生色团。己糖的吸收曲线是对称的, 并且在 396 及 430 nm 处的吸收值相等。6-脱氧己糖的最大吸收值位于 396 nm, 而在 430 nm 时吸收为零。所以, 当有己糖存在时, 对它进行定量测定, 取波长 396 及 430 nm 的吸收值之差值。加入半胱氨酸以前, 延长试样加热时间(从 3 分钟延长至 10 分钟)在很大程度上也可排除己糖的影响, 延长加热会使己糖的吸收值大大减小, 而这时, 6-脱氧己糖的吸收值几乎没有改变。

Dische 及 Shettles 法的优点是它的高特异性(表 15)及高灵敏度。 $D_{396}-D_{430}$ 光密度之间的差值与 6-脱氧己糖(岩藻糖或鼠李糖)的浓度在 1~50 微克范围内是直线关系。我们在测定复杂的碳水化合物成分中的 6-脱氧己糖的总含量时这个方法的重复性也很好。而且不需要对样品作预处理。同时 6-脱氧己糖(岩藻糖)的量与糖蛋白的量之间成正比关系(表 15, 实验 6)。

测定生物体液及组织中 6-脱氧己糖时所发生的某些困难已在前面讨论过了(Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971)。

游离 6-脱氧己糖的测定法

一般原理 这个方法是建立在 6-脱氧己糖受高碘酸氧化时所表现的特性的基础上。高碘酸氧化的实质是在于碘酸作用下带有自由羟基的两个相邻碳原子之间的键发生断裂。

同时, 每一个 CHOH -基形成一分子甲酸, 而从 CH_2OH -基(己糖)及 $\text{CHOH}-\text{CH}_3$ -基(6-脱氧己糖)则分别形成甲醛及乙

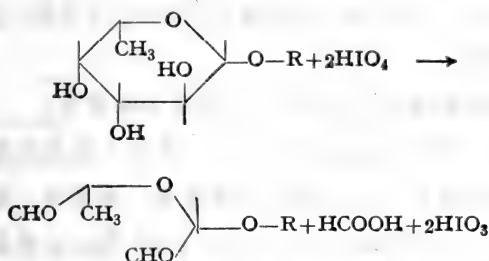
表 15 测定游离的及结合的 6-脱氧己糖方法的特异性

(Dische, Shettles, 1948)

实验 编号	物 质	浓度(克/升)	OD _{430nm}	OD _{396nm}	OD _{396nm} — OD _{430nm}
1	岩藻糖	0.01	0.007	0.222	+0.215
	半乳糖	0.025	0.074	0.074	0.000
	葡萄糖	0.025	0.117	0.118	+0.001
	糖 原	0.05	0.291	0.293	+0.002
2	岩藻糖	0.01	0.056	0.299	+0.243
	岩藻糖+RNA	0.01+0.1	0.052	0.296	+0.244
	透明质酸	0.25	0.026	0.031	+0.005
	硫酸软骨素	0.30	0.001	0.013	+0.012
	DNA	0.20	0.046	0.045	-0.001
3	岩藻糖	0.01	0.008	0.231	+0.223
	岩藻糖+半乳糖 +乙酰葡萄糖胺	0.01+0.04 +0.05	0.145	0.362	+0.217
	鼠李糖	0.01	0.007	0.212	+0.205
4	酵母腺苷酸	0.10	0.019	0.028	+0.009
	麦芽糖	0.05	0.127	0.126	-0.001
	果 糖	0.05	0.205	0.201	-0.004
	葡萄糖醛酸	0.10	0.016	0.017	+0.001
	半乳糖醛酸	0.20	0.044	0.052	+0.008
5	岩藻糖	0.01	0.008	0.233	+0.225
	岩藻糖+阿拉伯糖	0.01+0.08	0.028	0.260	+0.232
	岩藻糖+血清清蛋白	0.005+1.00	0.032	0.140	+0.108
6	A 血型的型特异物质	0.10	0.098	0.255	+0.157
	同 上	0.20	0.211	0.530	+0.317
	A 血型的型特异物质 的水解物	0.10	0.095	0.220	+0.125

醛*。

所以,在有其它糖类存在时(特别是己糖),6-脱氧己糖的定量测定的实质就是:有甲醛存在的情况下测定乙醛。显然,在高碘酸作用下只有当混合液中有游离的6-脱氧己糖(己糖)存在时才能对乙醛(甲醛)进行分离。其它化合物中形成糖苷键的6-脱氧己糖在高碘酸作用下不会形成乙醛:

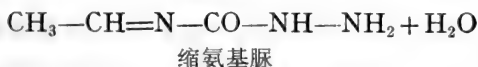


目前,有三种测定游离6-脱氧糖类的化学法。这些方法之间的区别在于与乙醛结合的试剂不同(Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971)。

下面分析一下由我们(Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971)略加改良的测定游离6-脱氧己糖的方法(Bhattacharyya, Aminoff, 1966)。

这个方法用在实验室条件下最为适宜。

这个方法的主要试剂是氨基脲盐酸盐,它与高碘酸氧化时释放出来的乙醛按照下列反应发生作用:



形成的缩氨基脲在波长 224 nm 处有最大吸收。

* 用高碘酸氧化丝氨酸及苏氨酸时也形成甲醛及乙醛。

试剂 6.7 mM 氨基脲盐酸盐溶液(溶于 0.06 M NaH_2PO_4 及 0.14 M Na_2HPO_4 中, pH 7.4)。

碘试剂, 由三种成分配成: 新配制的 0.2 M HIO_4 溶液 (1 体积), 0.2 M NaOH 溶液 (1.5 体积), 0.2 M 半胱氨酸溶液 (1.2 体积)。

在临实验之前将上述三种溶液直接混合配制成碘试剂。混合液的 pH 值应为 7.3~7.5。这试剂可用 2~2.5 小时, 过久就会在试剂中形成沉淀。

岩藻糖或鼠李糖的标准溶液(每毫升 100 微克)。

测定过程 测定在康维皿中进行。将 0.5 毫升待测试样放入康维皿外圈反应槽中。为了制作标准曲线, 再在另一些康维皿的外圈中分别放入 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 及 0.3 毫升标准溶液(相当于 5, 10, 15, 20, 25 及 30 微克岩藻糖)。将每个试样用水补足到 0.5 毫升。康维皿的中间凹槽中放入 1.5 毫升氨基脲溶液。外圈反应槽中很快地加入 2 毫升碘试剂, 立刻用玻璃板盖住预先涂有特制的滑润膏的康维皿。小心地搅动皿中所含的物质。同时用水代替岩藻糖作对照试验。将康维皿在室温中放置 2 小时。

然后将形成的缩氨基脲溶液从皿的中央槽转移到试管中, 在 CF-4A 分光光度计 224 nm 进行测定。在成批测定时, 不必用全部稀释的标准溶液作为标准, 而只要取 2~3 个已知其含量的岩藻糖样品就可以了。

这个方法是特异的(表 16), 在有其它糖类存在时可定量地测定 6-脱氧己糖 (Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971)。

但是, 必须指出, 如空气中有丙酮、环己酮及其它能与氨基脲相互作用的化合物存在时, 这个方法的灵敏度明显降低。

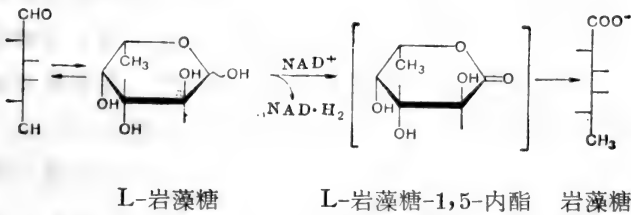
测定 6-脱氧己糖的酶学方法 目前在这方面已得到了第一批但却是十分受鼓舞的结果。已经建立了应用特异的 L-岩藻糖脱

表 16 有其它底物存在时, 游离 6-脱氧己糖(L-岩藻糖)测定法的专一性(Г. Я. Видершайн, Л. Г. Колибаба, 1971)

加入的物质	%	加入的物质	%
D-甘露糖	103.7	D-葡萄糖胺·HCl	94.2
D-葡萄糖	104	D-半乳糖+N-乙酰-	
D-葡萄糖-1-磷酸	90	D-葡萄糖胺+N-乙	
D-核糖	103.7	酰神经氨酸+对	
2-脱氧-D-核糖	101.8	硝基-苯基- α -L-吡喃	
N-乙酰神经氨酸	99.5	岩藻糖	100
D-葡萄糖胺·HCl	109.7	丙氨酸	108
D-半乳糖	102.4	缬氨酸	108
N-乙酰-D-葡萄糖胺	78.4	谷氨酸	105
同上 (0.2 μ M)	89	甲硫氨酸	102
同上 (0.1 μ M)	95.3	色氨酸	108.8
		苏氨酸 (0.12 μ M)	200

附注: 试样中岩藻糖含量—0.12 μ M, 各种所加物质的量(除括号中指明数量者外)—0.6 μ M。高碘酸氧化时混合液的 $E_{240\text{ nm}}^{1\text{cm}}$ 用岩藻糖溶液中的 $E_{224}^{1\text{cm}}$ 的百分比表示。

氢酶来测定游离 L-岩藻糖含量的方法。岩藻糖脱氢酶催化以下反应(Finch et al., 1969):



根据还原的 $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ 的量($\lambda_{\text{最大值}}=340\text{ nm}$)可以测定游离岩藻糖的量。有意义的是: 这个酶具有很窄的底物专一性, 它既不

能氧化 D-岩藻糖也不能氧化 L-鼠李糖。

所以,用酶学方法或许能在最近的将来定量地测定各种 6-脱氧己糖: L-岩藻糖、L-鼠李糖等。《专一性》这一概念,迄今它指的是在其它糖类存在时,总的测量 6-脱氧己糖的可能性。但是随着酶学方法的发展,它应当获得更为确切的涵义,应当能指明特异地测定某一种 6-脱氧己糖的可能性。

生物体液酮糖的测定

V. К. Городецкий, В. И. Михайлов

当有过量的醛糖存在时,对酮糖进行特异性的测定,不论在实验室或在临床研究中都具有十分巨大的意义:在不同原因的糖尿病(果糖尿,葡萄糖尿等)的诊断及治疗过程中对病人血和尿中果糖及蔗糖的含量测定;在给病人以某种糖负荷时体液中糖含量动态变化的测定;用菊糖测定肾小球的过滤作用速度时对尿中酮糖含量的测定等。但这还远不是酮糖测定法在临床上应用的一个完整的清单。

方 法 原 理

在临床及研究工作中还没有一个十分可靠的灵敏的特异的简便的直接测定酮糖的方法已被广泛的加以应用。建立在糠醛形成基础之上的方法能符合上述的要求。已经证明,在酸性环境中加热时从酮糖形成糠醛及羟甲基糠醛的速度比醛糖快 100 倍。选择酸浓度及反应温度的合适条件时,可以在完全保存醛糖的情况下使酮糖定量地转变成糠醛。形成的糠醛的量,可根据它与芳香族化合物缩合时形成的有色产物的量用比色法加以测定。这类芳香族化合物包括: 蒽酮 (Van Handel, 1968), β -吡啶乙酸 (B. K.

Городецкий, Е. И. Щорс, 1969; Heyrovsky, 1956), 硫巴比妥酸(Percheron, 1962)等。

除了测定试样中酮糖总量外,还可以在试样中测定还原性及非还原性酮糖的含量。为此,只要将试样加热并用碱处理。这时,所有还原糖被碱解成为有机酸,试样中只剩下非还原糖(蔗糖、棉子糖等)。根据酮糖的总含量与非还原性酮糖含量之差值即可算出还原性酮糖的含量。

为了精确地测定试样中的蔗糖,必需将试样用酵母转化酶(蔗糖酶)加以处理,转化酶可专一地将蔗糖水解成葡萄糖与果糖。然后用碱处理经转化酶处理过的或未经转化酶处理的试样。在转化酶处理前和处理后,再用碱处理过后的试样中酮糖含量的差额即是试样中蔗糖的含量。

为了个别的测定样品中所含的各种酮糖,为了验证在试管中测得的数据,可以采用定性及定量纸层析法(В. К. Городецкий, 1968),或纸电泳法。应当仔细地除去用于层析的特别是用于电泳的生物体液样品中的蛋白质、色素及盐类。用纸层析测定上述任何一个方法分离出来的糖时,都要应用特异的酮糖显色剂(间苯二酚显色剂,双美酮(5,5-二甲基环己烷二酮-[1,3])显色剂等)。

下面将叙述用硫巴比妥酸以及纸层析和纸电泳测定酮糖的方法。

试 剂

0.02M 硫巴比妥酸水溶液 (将硫巴比妥酸称样在加热下溶于水),此溶液在数日内稳定。

浓 HCl。

2 N NaOH。

活性动物碳«Карболен»(必须将片剂状碳磨碎,筛去灰尘)。

离子交换树脂 Amberlite IR-120[H^+] 或 Dowex D-50[H^+]。

离子交换树脂 Amberlite IRA-410[HCO_3^-] 或 Dowex D-I[HCO_3^-]。

酵母转化酶水溶液 (50~100 微克酶溶于 0.1 毫升水中)。转化酶(β -果糖苷酶)从啤酒酵母 *S. cerevisiae* 用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 吸附法制备。洗脱后将转化酶沉淀出来并冷冻干燥。50 微克冻干粉在 30°C 与反应物保温 30 分钟内可使 100 毫克蔗糖完全分解。

层析溶剂系统——丙酮:正丁醇:水(7:2:1)。

酮糖显色剂:

1) 间苯二酚显色剂 (500 毫克间苯二酚, 15 克三氯乙酸及 0.25 毫升 0.1 M CuSO_4 溶于 100 毫升正丁醇中)。

2) 双美酮显色剂 (300 毫克双美酮及 10 毫升正-磷酸, $d=1.74$, 溶于 90 毫升 96% 乙醇中)。

0.05 M 硼酸缓冲液($\text{pH } 8.5\sim 9.0$), 用于蔗糖水平纸电泳。

20% 乙醇水溶液。

0.3 N ZnSO_4 溶液。

0.3 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液。

层析用糖的标准样品(果糖及葡萄糖各 400 微克, 蔗糖 800 微克溶于 10 微升 50% 乙醇中), 每个点加样 50 微升。

标准蔗糖溶液, 0.3 μM 溶于 1 毫升水中或 1 毫升苯甲酸饱和的水中。

按硫巴比妥酸测定酮糖

测定尿中的酮糖之前应先将试样作脱除色素的处理。为此, 在 2 毫升新鲜的或用氯仿防腐后在冰箱保存的尿中加入 200 毫克活性炭«Карболен»。将试样振荡 10 分钟后离心(10分钟, 1000 g)。如果上清液仍具有颜色, 则应再用新的活性炭脱色一次。

将无色尿样品用离子交换树脂脱盐。将上清液倒入另一离心管中,加入 0.6 毫升阳离子交换树脂 Dowex D-50 $[H^+]$ 及阴离子交换树脂 Dowex D-1 $[HCO_3^-]$ 悬浮液。将混合物振荡 5~10 分钟,如果 CO_2 气泡不再形成,说明树脂的作用已停止。当在混合物中再加入少量新鲜树脂时,如果 CO_2 气体不再形成,表明脱盐完毕。然后将试样离心 5 分钟(1000g)。将上清液用于测定蔗糖。

分析血液样品时,首先应除去血液中的蛋白质。脱蛋白的最好方法是用硫酸锌或碱沉淀。在 1.0 毫升毛细管血或用肝素处理过的静脉血中加入 0.4 毫升 0.3 N $ZnSO_4$ 及 $Ba(OH)_2$, 摇匀后会有很多沉淀形成。将样品离心 10~15 分钟(1000g)。将离心液倒入试管中,再用 1 毫升水将沉淀搅动洗涤一次,将它离心后,将两份上清液合并,在回旋蒸发器中 $37^\circ C$ 蒸发至干燥。将蒸干的沉淀溶于 1 毫升蒸馏水中,用树脂按上法脱盐。血中及脑脊液中的酮糖含量常比尿中的少 10 倍到 100 倍,所以测定时要相应地增加待分析的血液或脑脊液样品的体积。血液样品脑脊液或组织抽提液不必用活性炭处理。

从脱盐,去色素及蛋白质后的待测体液的离心液中取出三份试样,每份 0.1 毫升(试样 A、B、C)。样品 A 中加入 0.1 毫升转化酶溶液及 0.6 毫升水(样品中转化酶的最终浓度约为每毫升 50 微克), $37^\circ C$ 保温 30 分钟,在保温期间应使样品 A 中的蔗糖全部水解成果糖和葡萄糖。样品 B 中加入 0.7 毫升水,样品 C 中加 0.9 毫升水。与转化酶一起保温后,试管 A 和 B 中各加入 0.2 毫升 2 N NaOH,在沸水浴中煮 15 分钟,这一处理使样品中的全部还原糖都转变成了有机酸。

三份样品的最终体积都是 1 毫升。每一样品中各加 0.02 M 硫巴比妥酸 1 毫升及浓 HCl 1 毫升,将试样搅匀后,盖上玻璃球在沸水浴中煮 6 分钟。同时将对照试验(1 毫升水,1 毫升硫巴比妥

酸及 1 毫升 HCl) 及含有 0.030, 0.075, 0.150 μM 的蔗糖标准溶液(相当于 0.10, 0.25, 0.50 毫升原始标准溶液及 0.90, 0.75, 0.50 毫升水) 加以处理。蔗糖标准溶液的试样中也各加入 1 毫升硫巴比妥酸及 1 毫升 HCl。煮沸 1~2 小时后, 试样中即出现黄色。将试样在 C Φ -4 分光光度计在波长 432.5 nm 下对空白试验进行测定。

按标准曲线计算样品中酮糖的量(蔗糖及果糖的微克数根据蔗糖的分子量为 342 及果糖的分子量为 180 计算)。按上述方法处理的生物体液试样中, 并没有完全把各种非碳水化合物性质的杂质除尽。在测定时, 这些杂质会产生有色背景。但是采用更为严格的纯化方法也是不适当的, 因为这会引起糖的变化或丢失, 也会增加方法学上的麻烦。不能用糖含量过高的试样作研究(超过 0.5 毫克/0.1 毫升), 因为用碱处理时, 这样的试样会变成褐色。所以样品的体积必须根据样品中所含糖浓度进行调整。

按下列方式计算样品中酮糖的含量。以样品 A 的数值作为颜色的本底, 样品 B 的数值作为非还原性酮糖的量和本底, 样品 C 的数值为酮糖总量和本底。B-A 之差额为样品中蔗糖的含量, C-B 之差额为还原性酮糖(主要是果糖)的量, C-A 之差额为全部酮糖的量。

纸层析及纸电泳法测定酮糖

在尿和其它体液中除了果糖及蔗糖以外, 往往还有其它酮糖存在。应用层析法及电泳法可以测定这些单糖及寡糖的含量。按上述方法进行样品的准备及纯化。样品在点到滤纸上以前, 一般先将它在回旋蒸发器中干燥(因为对于点样来说它的体积往往过大), 然后溶于 0.1 毫升水中, 再点于 Whatman 1 号纸上。样品中应含有 50~200 微克酮糖。糖的分离常用单相下行层析法, 在溶

剂系统丙酮:正丁醇:水(7:2:1)中进行。层析的时间在室温中为30~35小时,层析图谱干燥后用间苯二酚(均匀喷洒到层析图谱上后在160℃加热5分钟)或用双美酮(喷洒后,将层析图谱在室温下干燥,然后在110℃加热5分钟)进行显色。进行定量层析时,将层析纸先用20%乙醇洗涤。将层析图谱上与某一相应酮糖的一块滤纸剪下用蒸馏水加以洗脱(按每3cm²滤纸用1毫升蒸馏水计算)。然后用硫巴比妥酸法测定洗脱液中酮糖含量。

纸电泳法是测定酮糖的更快更灵敏的方法。果糖和蔗糖与硼酸盐阴离子形成的带有负电荷的复合物能满意地在Whatman 1号纸或Фильтрак纸上用低压水平电泳将它们分开(电压陡度为每厘米10伏特)。点样量只要20~50微克酮糖就足够了。电泳图谱用双美酮显色。感到不足的是用纸电泳作定性分析较好,但作定量分析较差。

方法的评价

上述测定酮糖的方法是很灵敏的。用硫巴比妥酸法可以测定试样中5微克酮糖,纸层析法及电泳法可检出20~15微克酮糖(用双美酮显色时)或可检出50~40微克酮糖(用间苯二酚显色时)。用硫巴比妥酸测定酮糖时形成稳定的黄色,后者可以在它形成后的1~2小时或更长时间内用比色法测定。颜色的强度与样品中的酮糖含量(低于50微克时)成正比。超过这个含量线性关系就破坏。这个方法具有高特异性,可测定低于1%的醛糖。硫巴比妥酸法有很好的重复性,可以满意地检出加于尿中的酮糖。

健康人每升尿中发现约有0.2~0.5克蔗糖及高达0.05~0.1克/升的果糖。在健康人的尿中我们还没有发现有超过1克/升的蔗糖,甚至在过量服用蔗糖时也如此。在果糖尿及蔗糖尿病人中,这类糖在尿中的含量可以增加几个数量级。

人肠粘膜二糖分解酶类活力的测定

И. С. Лукомская

人小肠粘膜中的二糖酶类能分解从食物进入小肠的二糖（麦芽糖，蔗糖，乳糖，海藻糖等），以及由胰 α -淀粉酶水解多糖时（糖原及淀粉）形成的带有 α -1,4-及 α -1,6-键的二糖和寡糖。

由于二糖酶的作用二糖被分解成单糖。单糖经肠粘膜被吸收并进入血液中。麦芽糖，异麦芽糖及海藻糖被分解成二分子葡萄糖，蔗糖被分解成葡萄糖及果糖，乳糖则被分解成葡萄糖及半乳糖。

肠粘膜中的二糖酶分布于柱状上皮的微绒毛膜中，这些绒毛膜形成的刷状层面向肠腔。肠腔内容物中所含的二糖酶活力与肠粘膜中所含的酶活力只有很小的差别，这样的差别在二糖酶及寡糖酶的整个分解过程中并不具有实质上的意义。

在人的肠腔中含有某些二糖酶(Dahlqvist, 1970)：异麦芽糖酶(麦芽糖酶 Ia), EC 3.2.1.10, EC 3.2.1.20*能催化异麦芽糖中的及分叉的寡糖中的 α -1,6-键的分解，并且也具有麦芽糖酶的活力；转化酶(麦芽糖酶 Ib), EC 3.2.1.48, 能分解麦芽糖，寡聚及多聚糖类。能水解二糖海藻糖的特异酶海藻糖酶, EC 3.2.1.28; 分解乳糖的乳糖酶, EC 3.2.1.23(表 17)。

不能耐受二糖的人的许多病是由于在肠粘膜中一种或几种二糖酶的缺乏或活力降低所引起的。如果能得到及时而正确的诊断，这种疾病可能得到治疗。确定不耐受性的原因最正确的最直接的方法是测定人的小肠粘膜活组织材料中的二糖酶类的活力。

* 异麦芽糖酶(麦芽糖酶 Ia)有两个编号，因为它既分解 α -1,6-键的寡糖(EC 3.2.1.10), 又分解带 α -1,4-键的寡糖(EC 3.2.1.20)。

材 料

用组织活检材料作二糖酶活力的测定。活检材料或者取自空肠粘膜，或者取自十二指肠与空肠交界区的粘膜。几个毫克的组织就足够用于测定酶活力。但是要得到较为正确的结果，最好有10~20毫克(湿重)组织。将活检材料放入预冷试管中。如果在1~2小时内不可能进行酶活力测定的话，则应将活检组织冰冻并贮存于-20℃下。

表 17 人肠粘膜中二糖酶类的特异性(Dahlqvist, 1970)

酶	底 物	底物总活力的%
异麦芽糖酶(麦芽糖酶 Ia)	异麦芽糖	>99
	麦 芽 糖	~50
转化酶(麦芽糖酶 Ib)	蔗 糖	100
	麦 芽 糖	~25
麦芽糖酶II及III(葡萄糖淀粉酶, 耐热性麦芽糖酶)	麦 芽 糖	~25
	异麦芽糖	<1
海藻糖酶	海 藻 糖	100
乳 糖 酶	乳 糖	100
	杂-β-半乳糖苷	<50

匀浆的制备 将10~20毫克(湿重)肠粘膜与0.5毫升水及玻璃砂一起在一个小匀浆器中磨碎。应将组织预先冷却，在匀浆过程中也要用碎冰块将它冷却。匀浆1~2分钟后(转速每分钟200~300转)。过大的速度及冷却不足都会引起酶活力大大降低。可以将匀浆以冰冻状态保存，冰冻与融化并不会影响酶活力。

用蒸馏水稀释匀浆。用10~20毫克组织在0.5毫升水中制

备匀浆时,常用下列稀释度:用于测定麦芽糖酶活力时——1:50,异麦芽糖酶活力时——1:20;转化酶活力时——1:20;海藻糖酶活力时——1:5;乳糖酶活力时——1:5。根据各二糖被分解时形成的葡萄糖量来测定二糖酶的活力。用专一的葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖(И. С. Лукомская, В. К. Городецкий, 1961)。

试 剂

二糖: 麦芽糖, 异麦芽糖, 蔗糖, 海藻糖, 乳糖。

0.1 M 磷酸钠缓冲液(pH6.0)。

0.1 M 顺丁烯二酸缓冲液(pH6.0)。1.16 克顺丁烯二酸溶于 15.3 毫升 1 N NaOH 中, 用水调至 100 毫升, 测 pH, 必要时调整 pH 到 6.0。

0.5 M 乙酸缓冲液 (pH4.8)。将 240 毫升 1 M 乙酸钠溶液与 160 毫升 1 N 乙酸及 400 毫升水混合。

0.1% 邻联甲苯胺 (100 毫克邻联甲苯胺溶于 10 毫升无水乙醇中)。

苯甲酸饱和水溶液。

0.3 N Ba(OH)₂。

5% ZnSO₄ 溶液。将上述两个溶液等体积混合时, 混合液的 pH 应该是中性的。

底物 制成 0.056 M 二糖溶液[溶在 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 中或 0.1 M 顺丁烯二酸缓冲液中 (pH 6.0)]。底物-缓冲液分小批量以冰冻状态贮存, 用时, 取所需量而融化之。

葡萄糖氧化酶试剂 将 10 毫克过氧化物酶及 50 毫克葡萄糖氧化酶(苏联制, 活力为 90000 Q_{O₂})溶于 800 毫升 0.5 M 乙酸缓冲液中 (pH 4.8), 加入 10 毫升 0.1% 邻联甲苯胺溶液, 将体积调到 1000 毫升, 过滤后将试剂贮存在带磨口塞的棕色瓶子中, 放于冰

箱中。此试剂可用 1~2 个月。

标准(原始)葡萄糖溶液 90毫克葡萄糖溶于 100 毫升苯甲酸饱和水溶液中($5\mu M/ml$)。这样的葡萄糖溶液可贮存一年。

测 定 过 程

在刻度试管中加入 0.1 毫升稀释的匀浆, 放入 $37^{\circ}C$ 水浴中, 几分钟后加入 0.1 毫升底物-缓冲液混合物, 将试样搅匀, 于 $37^{\circ}C$ 保温 60 分钟后, 立刻加入 0.3 毫升水, 并于沸水浴中放 2 分钟以停止反应。对照组的试管中加 0.1 毫升稀释匀浆液, 0.3 毫升水及 0.1 毫升底物-缓冲液。混匀后立刻放在沸水浴中 2 分钟。

冷却后向已失活的酶试样中加入 2.5 毫升葡萄糖氧化酶试剂, 使生成蓝色, 用分光光度计在波长 620 nm, 以 2.5 毫升葡萄糖试剂与 0.5 毫升水的混合液作对照测定样品光密度。将原始葡萄糖溶液稀释, 使每 0.5 毫升溶液中含有 0.1, 0.2, 及 $0.5\mu M$ 葡萄糖, 以作为标准葡萄糖溶液。向 0.5 毫升标准葡萄糖溶液中加入 2.5 毫升葡萄糖氧化酶试剂。

将葡萄糖氧化酶试剂加入含有葡萄糖的溶液中后, 形成的颜色的强度逐渐增加, 13~16 分钟后达到最大, 保持数分钟后又慢慢下降。达到颜色强度的最大值所需的时间及持续的时间长短与葡萄糖氧化酶试剂中葡萄糖氧化酶的浓度, 与测定时所选择的温度及其它因素有关。所以, 对每一批样品的测定都应该摸索出达到最大颜色强度所需的时间, 以后对每一个样品测定时, 就要严格地控制在相同的时间(一般在加入葡萄糖氧化酶试剂后 14~16 分钟用分光光度计进行测量)。

测定转化酶活力时, 用 $Ba(OH)_2$ 及 $ZnSO_4$ 来停止反应。为此, 在 0.2 毫升保温后的试样中加入 0.3 毫升水及 0.1 毫升 $0.3 N Ba(OH)_2$ 和 0.1 毫升 5% $ZnSO_4$, 将混合液搅匀。在 0.5 毫升

对照试样及标准葡萄糖溶液中也加入 0.1 毫升 0.3 N Ba(OH)₂ 及 0.1 毫升 5% ZnSO₄。将试样在 1700 g 离心 10 分钟。

从上清液吸出 0.5 毫升, 加入 2.5 毫升葡萄糖氧化酶试剂, 按上述方法进行测定。

按葡萄糖标准溶液制作的标准曲线计算二糖水解时所形成的葡萄糖的量。

能在 1 分钟内催化 1 μM 二糖分解的酶量定为二糖酶的一个活力单位。二糖酶的比活力以每克蛋白质所具有的活力单位数表示(表 18)。

表 18 人小肠粘膜中二糖酶的活力(Dahlqvist, 1970)

二 糖 酶	活力(单位/克蛋白质)
麦芽糖酶	266(111~420)
异麦芽糖酶	97(25~183)
转 化 酶	87(26~138)
乳 糖 酶	44(9~98)

附注: 活检组织取自十二指肠与空肠交界区。对 22 个健康成年人进行了测定, 括号内为二糖酶活力变动的范围。

用于胎儿期 Tay-Sachs 症诊断及检出疾病的 的杂合子携带者的 N -乙酰- β -D-氨基己糖 苷酶 A 活力的测定法

И. В. Цветкова, А. Б. Козина

遗传性糖脂代谢障碍症, 特别是氨基己糖苷酶 A 缺乏症(Tay-Sachs 症) 的确切诊断只有通过测定该酶的活力才能完成。氨基

己糖苷酶 A 不足就导致上述疾病。已经证明 (Okada, O'Brien, 1969): Tay-Sachs 症是由于 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶的同功酶 A (EC 3.5.1.52) 的显著减少或缺乏所引起的。此酶催化从神经节苷脂 GM2 切下末端残基 *N*-乙酰氨基半乳糖的反应。因为 Tay-Sachs 症是不治之症, 在早幼年期就引起死亡, 所以必须在婴儿出生前作出诊断, 以便一旦确诊有这种病时就采取人工引产。测定羊膜液及细胞中所含的 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 的活力可作出诊断。为了预防 Tay-Sachs 症也必须检出杂合子携带者病人, 这种病人的酶活力只有正常人的一半左右。*N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 活力的测定通常是在白细胞及血清中进行的。除了定量的测定酶活力作为产前诊断之外, 也可用电泳法来检出 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A。

N-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 活力的定量测定

方 法 原 理

这个方法的根据是: *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 是不耐热的, 将待测的湿组织样品于 56°C pH 5 下加热 3 小时, 酶即全部失活 (O'Brien et al., 1970)。正常情况下, 组织及体液中有两种 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶的异构型 (изоформа): A 及 B, 这两个同功酶酶活力的累加值也就是酶的总活力。根据加热前 (A+B 两型酶的总活力算作 100%) 及加热后 (耐热型 B 的活力) 从酶活力的差额算出酶 A 的相对活力。以对-硝基苯- β -D-*N*-乙酰氨基葡萄糖苷 (Koch-Light 公司, 英国) 为底物, 当 *N*-乙酰氨基己糖苷酶 A 将它分解时就形成游离的酚, 后者的数量可用分光光度计在 400 nm 加以测定。

研究的样品

将血液在 1000g 离心 30 分钟制备血清。有 0.25~0.5 毫升血清就足够用作分析了。

为了制备白细胞，将 9 毫升静脉血与 1 毫升 6% EDTA (pH 7.0) 溶液相混匀，在冰箱中放过夜。将血浆从血球物质上面完全吸出，于 300~600 g 冷冻离心 15~20 分钟，除去血浆。将白细胞沉淀悬浮在 1 毫升水中进行匀浆。用反复冻融 4 次或加 Triton X-100 (最终浓度为 0.2%) 使白细胞破坏。离心后得到的白细胞抽提液就可作为酶制剂应用。

从怀孕 18 星期的孕妇用羊膜腔穿刺术取出 10 毫升羊膜液样品，600 g 离心 15 分钟分离出细胞。将细胞在 0.4~0.6 毫升水中进行匀浆，按制备白细胞的方法作进一步处理。

测定过程

将待测样品(白细胞或羊膜细胞提取液)与 0.1 M 柠檬酸缓冲液 (pH 4.8) 按 1:1 的比例相混合，而羊水及血清则按 3:1 及 4:1 的比例。将样品分成两半，一份放于冰中，另一份放于 56°C 水浴中加热 3 小时，然后从每一份样品中各取出两个平行的试样，每个试样的体积为 0.2 毫升，加入 0.05 毫升 7.5 mM 对-硝基苯- β -D-N-乙酰葡萄糖苷，37°C 保温 1 小时，在试样中加入 0.35 毫升 5% 三氯乙酸溶液，600 g 离心 10 分钟除去蛋白质沉淀。在 0.2~0.4 毫升上清液中加入 0.4 毫升甘氨酸缓冲液 (pH 10.4) 至体积为 3 毫升。用分光光度计 C Φ -4 波长 400 nm 测量有色样品的光密度。根据标准曲线计算被酶切下来的对-硝基苯酚的量。

在正常情况下，健康人血清中 N-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 的相对含量，以平均值计算一般为 52% (47~69)；杂合子携带

者——35% (24~46)。而在白细胞中这个同功酶的 含量为 61% (55~69) 及 40% (25~48)。

正常人羊膜液中 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 的活力平均为 18 (12~29), 而在羊膜细胞中则为 31% (17~48)。羊膜液中没有酶的活力或酶活力降低到低于 10% 的数值时就应当认为胎儿是患了 Tay-Sachs 症, 妊娠即应中止。如果时间上可能时最好是在羊膜液的培养细胞中测定 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 的活力。

为了要迅速对羊膜液作出诊断可以用电泳法检出 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A。

用琼脂糖凝胶电泳显示 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶 A 的方法

这个方法是根据同功酶 A 及 B 所带的电荷多少不同, 从而使这两种 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶具有不同的电泳迁移率。

按 Ohman 等人 (1971) 的方法在琼脂糖凝胶上进行电泳。凝胶板按下法制作: 在载玻片 (2.5×8 cm) 上倒上 2 毫升 1% 琼脂糖溶液 (溶于 pH 6.0 的 0.04 *M* 磷酸-乙酸盐缓冲液中), 琼脂糖溶液先在沸水浴中加热 30 分钟。将胶板在一个潮湿的匣子中 2°C 放 24 小时。在凝胶板中间横向的位置上加上 10 微升原始的或浓缩 2~3 倍的羊水或羊膜细胞提取液。将 6 块凝胶板一起放入通有冷却水的电泳槽内 (3~5°C)。电泳的条件: 0.04 *M* 乙酸-磷酸盐缓冲液 (pH 6.0), 电压 200 V, 电流 50~60 mA, 电泳时间 1 小时。电泳后在凝胶表面上倒上底物溶液: 1 *mM* 4-甲基伞形基- β -D-*N*-乙酰氨基葡萄糖苷 (4-methylumbelliferyl- β -D-*N*-acetylglucosaminide) (溶于 0.1 *M* 柠檬酸溶液中, pH 4.4) 37°C 保温 1 小时, 然后倾出底物, 在凝胶板上小心地喷洒上 1 *M* 甘氨酸-碳酸盐缓冲液 (pH 11.0), 根据从底物中被酶切下来的 4-甲基伞形酮在 366 nm

紫外光照射下所产生的荧光定出A型及B型同功酶分布位置。为此,采用BUO-1型紫外光灯。*N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶A呈条带状走在阴极一端,而B型酶位于原点或稍向正极移动。患Tay-Sachs症的胎儿中见不到A酶(图9)。

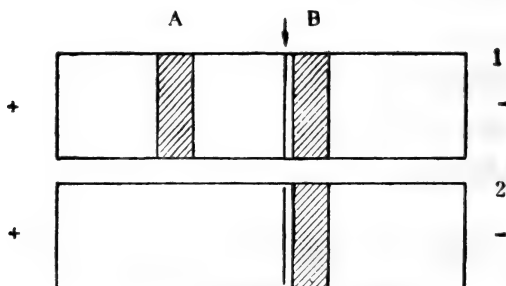


图9 *N*-乙酰- β -D-氨基己糖苷酶A及B的琼脂糖凝胶电泳分离
1——正常; 2——Tay-Sachs症

糖原积累症的生化诊断方法

И. А. Попова, И. В. Чибисов

糖原病或糖原积累症是遗传病。这种病是由于缺乏某种分解糖原的酶或这种酶的活力不足所引起的。糖原积累症的特征是病人的病变器官或组织中有大量糖原的积累。目前在文献中已记载有几百个病例。已经确定,糖原积累症的分布为1:40000。

根据临床症状可将糖原积累症分成肝型、肌肉型及全身型三型。根据所缺酶的性质可将糖原积累症分成许多类型(表19)。

糖原积累症的生物化学诊断分两步进行:第一步是用某种糖或激素作负荷试验。应用这种负荷试验可以将糖原积累症与临床症状相似的其它疾病区分开来。第二步是进行病变组织(肝、肌肉)

表 19 糖原积累症分类

病的名称	酶的缺陷	发现酶缺陷的器官	病 型
I 型, Von Gierke 氏症	葡萄糖-6-磷酸酶	肝、肾、小肠粘膜	肝型
II 型, Pompe 氏症	酸性 α -葡糖苷酶	肝、肾、脾、肌肉 白细胞、神经系统	全身型
III 型, Cori 氏症	淀粉-1,6-葡糖苷酶	肝、肌肉、白细胞 红细胞	肝型、肌肉型
IV 型, Anderson 氏症	支链酶	肝、肌肉、白细胞	肝型
V 型, McArdle 氏症	磷酸化酶	肌肉	肌肉型
VI 型, Hers 氏症	同 上	肝	肝型
VII 型, Thomson 氏症	磷酸葡萄糖变位酶	肝、肌肉	肝型、肌肉型
VIII 型, Tarui 氏症	磷酸果糖激酶	肌肉、红细胞	肌肉型
IX 型, Xar 氏症	磷酸化酶 b 激酶	肝	肝型
X 型	蛋白激酶	肝	肝型

的活检，测定这些活检标本中的糖原含量和糖原的结构以及测定与糖原代谢有关的酶的活力。应用这种两步检查法就可最后确定糖原积累症及其类型。

测定肝型糖原积累症病人血液中（空腹和用糖与激素作负荷后）葡萄糖，还原性物质及乳糖的含量。取 0.1 毫升毛细血管血作分析。用 0.4 毫升 0.3 N ZnSO₄ 溶液及 0.4 毫升 0.3 N NaOH 溶液沉淀蛋白质。用水将试样体积补足到 2 毫升，离心，测定上清液中糖的含量：

1) 测定葡萄糖用葡萄糖氧化酶法(И. С. Лукомская, В. К.

Городецкий, 1961)。

2) 测定还原糖按 Nelson 法(1944)。

3) 测定血乳糖用对羟二苯试剂 (Barker, Summerson, 1941)。

负 荷 试 验

糖 负 荷

做负荷试验前两个星期内病人膳食中的脂肪、糖及蛋白质的量应按年龄计算定量供给。最后一次进餐后 12 小时给予 25~30% 的糖水, 用量按下列数据计算:

年 龄	糖(克)/体重(公斤)
0~6 个月	3.0
7~11 个月	2.5
1~3 岁	2.0
4~16 岁	1.75
成 人	1.0

最低剂量为 10 克, 最高不得超过 50 克糖。有明显低血糖症的儿童及小于 1 岁的病人作负荷试验时, 应在最后一次进餐后 5~7 小时开始。服糖前 15 分钟及临进餐前取毛细管血, 服糖后每隔 15, 30, 60, 90, 120, 150 及 180 分钟取血。

对于肝型糖原积累症病人除了 IV 型(缺支链酶)外, 都有低血糖病征。有 I 型糖原积累症(缺葡萄糖-6-磷酸酶)的病人有高乳糖血症及低血糖血症(空腹)的症状。

在葡萄糖负荷的情况下, 几乎在所有各类糖原积累症病人的血中都可以观察到葡萄糖含量的长时间升高, 而在 III 型糖原积累症中(淀粉 1, 6-葡糖苷酶缺乏)发现有特别的血糖曲线的多峰性。

所有各类糖原积累症中(除 I 型外)乳糖的含量要么没有变化,要么只有很不明显的增加。在 I 型糖原积累症中作葡萄糖负荷试验时会引起血中乳糖含量的降低。

在检出肝型糖原积累症时,乳糖负荷试验具有极大的意义。注射乳糖后引起糖原积累症患者的末梢血中乳糖含量明显升高。由于有发生急性酸毒症的危险,对疑为 I 型糖原积累症的病人不要作乳糖负荷试验。有肝糖原积累症的病人,作乳糖负荷后,几乎所有出现于血液中的糖都是葡萄糖,但是正常人血糖升高是由乳糖引起的。

肾上腺素负荷

作肾上腺素负荷时,应在注射肾上腺素前 15 分钟及在临注射之前取血样作分析。然后肌肉注射 0.1% 肾上腺素,按每岁 0.1 毫升计算,但总量不得超过 1 毫升。注射肾上腺素后 20, 40, 60, 80, 100 分钟取血作分析。

众所周知,在正常情况下,注射肾上腺素会引起血中葡萄糖含量增加。肾上腺素负荷时, I 型糖原积累症病人中未发现血葡萄糖增加。III 型糖原积累症病人中,进餐后短时间内作肾上腺素负荷时,跟正常人一样也引起血葡萄糖增高。但在空腹时作负荷试验时,不引起血糖的增加。注射肾上腺素后研究糖原积累症病人的血乳糖曲线时未见与正常人的曲线有明显的偏离,但是 I 型糖原积累症病人在注射肾上腺素后血乳糖含量明显升高。

局部负荷试验

对肌肉型糖原积累症病人所作的第一步研究是作局部负荷试验。这种试验的目的是弄清肌肉中糖原分解的紊乱,可根据在局部条件下肌肉收缩后乳糖形成的量来判断这种紊乱的情况 (Thom-

son., 1963)。试验在空腹进行。给病人手上带上两只血压计袖带。第一只袖带绑在前臂下部 1/3 处。打入空气至 200mm 汞柱, 一直保持到试验结束。这样做的目的是为了消除手上动-静脉分流。第二只袖带绑在上臂中间 1/3 处, 从肘静脉抽取血样, 给袖带加压至 200 mm 汞柱。让病人工作(活动)45 秒钟, 同时从血压计上取下梨形球。病人工作开始后 2 分钟取下绑于上臂的袖带, 在 10~15 分钟内从肘静脉取血 1 毫升, 放入盛有 5 毫克 NaF 的试管中, 将试样离心, 测定血浆中葡萄糖及乳糖的浓度。对健康人作局部负荷试验时发现乳糖升高至 0.3~0.5 克/升, 而在肌糖原分解受到破坏的病人血液中的乳糖含量则没有升高, 或只有很不明显的升高(0.05~0.1 克/升)。

为了最后确定糖原积累症的类型, 要进行肝组织及肌肉组织的活检。测定活检样品中糖原的浓度、结构及与糖原代谢有关的酶的活力。首先应该测定的酶是磷酸化酶、淀粉-1, 6-葡萄糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸酶及酸性 α -葡萄糖糖苷酶。

活检组织的分析

用穿刺或手术取肝或肌肉的活检材料。将它迅速放入干燥的小试管中, 紧密盖住, 用干冰在 -78°C 立刻将待测材料冻结, 可保存数天。因某种原因而融化了的组织不能再次结冻, 也不能再用于分析, 因为融化后某些酶已失活了。若只要得到有关酶活力及糖原含量的最低限度的信息, 只需要 30 毫克肝组织或 200 毫克肌肉组织就足够了。为了进行全部分析并得到某些额外的资料, 最好有一克左右的组织。

组织中糖原的含量及结构的测定

为了分离糖原将 10 毫克肝或 100 毫克肌肉放入盛有 1 毫升

30% KOH 的试管中,在沸水浴中加热 30 分钟,然后将试管冷却,加 3 毫升 96% 乙醇,在冷处放 5 小时,离心,形成的沉淀用 70% 乙醇洗涤四次,放真空干燥器中干燥。将试样中的糖原用酸或酶分解后,用葡萄糖氧化酶法测定形成的葡萄糖的量。为此,将所得糖原沉淀溶解于 2 毫升水中,取 0.1 毫升作水解。

用酸水解时,在 0.1 毫升溶液中加入 0.5 毫升 1 NH_2SO_4 ,在沸水浴中加热 3 小时后将样品冷却,用 1 N NaOH 中和,以酚酞作指示剂,测定形成的葡萄糖量。用酶水解时,于 0.1 毫升溶液中加入 0.2 毫升 0.2 M 乙酸缓冲液 (pH 4.8, 每毫升含有 5 毫克淀粉葡萄糖苷酶),能把糖原完全酶解成葡萄糖用蒸馏水将混合液总体积调到 1 毫升。

在 30°C 保温 3 小时,直接测定试样中葡萄糖的含量。为了计算糖原的含量,将测得的葡萄糖量乘系数 0.93。

如果肝组织的量很少不足以分离糖原时,可采用更为简单的方法测定肝组织中糖原的含量(Huijing, 1970)。为此,在 0.1 毫升 1% 组织匀浆中加入 0.2 毫升 0.2 M 乙酸缓冲液 (pH 4.8, 含有淀粉葡萄糖苷酶 5 毫克/毫升), 30°C 保温 3 小时,测定葡萄糖含量。

用 Krisman (1962)提出的方法用 β -淀粉酶研究分离出来的糖原的结构。

Krisman 法包括测定多糖与碘的复合物的吸收光谱及最大吸收的位置,后者与被研究的多糖的结构有关。例如,碘与糖原的复合物,其最大吸收在 410~460 nm, 碘与极限糊精(由于磷酸化酶作用而形成的带有短侧链的糖原)的复合物——390 nm, 碘与支链淀粉复合物——540 nm。测定时,在体积为 0.2 毫升的含有 30~50 微克糖原的试样中加入 1.3 毫升 Krisman 试剂。这个试剂的制备法如下:在用前将 26 毫升 5.55 $M\text{CaCl}_2$ 与 0.1 毫升 2.6% I_2 ,

溶液(溶于 26% KI 水溶液中)相混匀。用微量比色杯在波长 350~620 nm 范围内测出吸收光谱。

也可以根据在 β -淀粉酶作用下多糖水解的程度来判断多糖的结构。已知在这个酶作用下糖原的分解是~50%，极限糊精的分解是~15~20%，支链淀粉的分解是~65%。为了测定其含量，取 0.4 毫升含有 40 微克左右的多糖溶液，加 0.1 毫升 0.02 M 乙酸缓冲液(pH 5.0)，缓冲液中含有 β -淀粉酶，其终浓度为每毫升 2 毫克。加入 0.1 毫升 0.3 N Ba(OH)₂ 及 0.1 毫升 0.3 N ZnSO₄ 以停止反应，将试样离心，用 Nelson 法测定上清液中还原糖的含量，用前面所述的酶学方法测定样品中多糖的准确浓度，然后算出由 β -淀粉酶引起的多糖水解的百分比。

酶活力的测定

用微量法(Hers, 1964)测定组织中酶的活力。将活检组织称重，剪碎，与 9 倍及 99 倍量的蒸馏水一起匀浆。匀浆液可贮存于冰中供几小时内作研究之用，也可让它冰冻贮存。将匀浆液，特别是将稀释的匀浆液反复冻融会使某些酶的活力丧失，所以首先要测定不稳定的酶：磷酸化酶及葡萄糖-6-磷酸酶。

磷酸化酶(1, 4- α -D-葡聚糖：正磷酸- α -葡萄糖基-转移酶, EC 2.4.1.1)

磷酸化酶催化由糖原分子的非还原端葡萄糖残基转移无机磷酸的可逆转移反应。这个酶以彼此可以互相转化的形式存在：可将它们分成《活化型》与《非活化型》。《活化型》的磷酸化酶在没有 AMP 时也能显出自己的活力。《非活化型》的磷酸化酶或者在有 AMP 时也无活力(如肝磷酸化酶)，或者只有在 AMP 存在时才有活力(如肌肉磷酸化酶)。

所以在肝中能测定的只是活化型磷酸化酶，而在肌肉中则对总的磷酸化酶活力（有 AMP 存在时）与单独的磷酸化酶活力（无 AMP 时）都可以测定。

利用在有 AMP 或无 AMP 存在的情况下酶具有从葡萄糖-1-磷酸释放出无机磷的能力，可以测定组织匀浆中磷酸化酶的活力。底物混合液含有：0.1 M 葡萄糖-1-磷酸，2% 糖原，0.03 M AMP，0.2 M NaF (pH 6.1)。于 0.05 毫升底物混合液中加入 0.05 毫升 1% 组织匀浆，37°C 保温 0, 10, 20, 40 分钟。保温后，加入 0.5 毫升 10% 三氯乙酸及 3.7 毫升冰冷蒸馏水，离心除去形成的沉淀，按 Fiske-Subbarow 法测定上清液中形成的无机磷含量。为此，在样品中加入 0.5 毫升含有等体积的 2.5% 钼酸铵与 5 N H₂SO₄ 的混合液及 0.2 毫升氨基萘酚磺酸钠碱性溶液。10 分钟后，测定 620 nm 的光密度，计算出无机磷的含量。在这样的条件下，释放出的无机磷的量与反应时间及酶量成正比。

用 1 克组织在 1 分钟内能释放出的磷的 μM 数表示酶的活力单位。正常人肝组织的酶活力为 15~55 单位，肌肉则为 60~140 单位。一般说，如果骨骼肌中完全没有磷酸化酶，表示患有 Мак-Ардля 氏症（糖原积累症 V 型）。对于糖原积累症 VI 型来说，肝脏磷酸化酶活力降低是其特征。

淀粉-1, 6-葡萄糖苷酶(糊精-6- α -葡萄糖 苷酶, EC 3.2.1.33)

淀粉-1, 6-葡萄糖苷酶是催化糖原分子上分叉点上的 α -1, 6-键分解的酶。糖原磷酸解时形成极限糊精，极限糊精先受寡聚-1, 4-1, 4-葡聚糖转移酶(酶的转移活力)的作用，然后在淀粉-1, 6-葡萄糖苷酶的作用下水解出葡萄糖(酶的水解活力)。

一般，为了测定这个酶在组织中的活力，以糖原极限糊精作为

底物，并测定用组织匀浆处理底物时所形成的葡萄糖量。取 0.05 毫升 1% 组织匀浆，与 0.05 毫升含有 2% 磷酸化酶的极限糊精，0.1 M 组氨酸(pH 6.5)，5 m M EDTA 的底物混合液相混匀。极限糊精按 Hers 法制备(Hers, 1964)。将此混合液于 37°C 保温 2 小时。对照试验不保温。为了考虑到组织匀浆中还有其它葡萄糖苷酶对底物的作用，同时将组织匀浆液与含有与极限糊精的量相同的糖原来代替极限糊精作为底物混合液进行保温。保温后用等体积(0.05 毫升)的 0.15 M Ba(OH)₂ 及 0.15 M ZnSO₄ 混合液沉淀蛋白质，加入 0.5 毫升水，离心除去沉淀，用葡萄糖氧化酶法测定上清液中形成的葡萄糖量。计算 1 克组织 1 分钟内能形成的葡萄糖 μ M 数表示淀粉-1,6-葡萄糖苷酶的活力单位。

正常人的肝及肌肉中淀粉-1,6-葡萄糖苷酶的活力分别在 0.4~1.2 及 0.2~0.7 单位的范围内。如果肝及肌肉中完全没有淀粉-1,6-葡萄糖苷酶，即为患Ⅲ型糖原积累症的指征。根据酶缺乏的组织部位(肝，肌肉)，也根据所缺乏的是淀粉-1,6-葡萄糖苷酶的那一种酶活力(转移活力还是水解活力)可把糖原积累症Ⅲ型分成四种亚型(a, b, c, d)。Ⅲ型糖原积累症的特点是在病变组织中含有短侧链的糖原(极限糊精)的积累。所以，也把Ⅲ型糖原积累症称为极限糊精积累症。

葡萄糖-6-磷酸酶(D-葡萄糖-6-磷酸酯磷酸水解酶, EC 3.1.3.9)

葡萄糖-6-磷酸酶是催化从葡萄糖-6-磷酸分解出磷酸的特异酶。在人体中已在肝、肾及小肠粘膜中发现这种酶。肝脏匀浆在 37°C, pH 5.0 时，葡萄糖-6-磷酸酶在几分钟内就完全失活。根据葡萄糖-6-磷酸与组织匀浆一起保温时从葡萄糖-6-磷酸释放出来的无机磷来测定葡萄糖-6-磷酸酶的活力。有 EDTA 存在时酶反

应在 1 小时内是成直线的(无机磷含量的增长与时间成正比)。为了测定葡萄糖-6-磷酸酶的活力,将 0.1 毫升混合液 (0.1 M 葡萄糖-6-磷酸二钠盐溶于 2 mM EDTA 溶液中, pH 6.5) 与 0.1 毫升 1% 组织匀浆相混合, 37°C 保温 60 分钟。对照试样不保温。测定组织匀浆中该酶活力时, 特别是当酶活力很低时, 十分重要的是要考虑到非特异性磷酸酶对底物的水解。为此, 要设置一组对照试验。在对照试验中, 特异性的葡萄糖-6-磷酸酶在酸性 pH 下保温时即失去活力。为此, 在 0.1 毫升 1% 组织匀浆中加入 0.01 毫升 0.1 M 乙酸缓冲液 (pH 5.0), 37°C 保温 5 分钟, 然后于混合液中加入底物, 保温 60 分钟。保温后, 按 Fiske-Subbarow 法测定实验及对照样品中所形成的无机磷含量, 计算出特异的葡萄糖-6-磷酸酶的活力。并以每克组织在 1 分钟内所形成的无机磷的 μM 数来表示酶的活力。正常人肝中葡萄糖-6-磷酸酶活力为 4~13 单位。完全没有该酶活力是 Von Gierke 氏症(糖原积累症 I 型) 的特征。

酸性 α -葡萄糖苷酶(1,4- α -D-葡聚糖-葡萄糖 糖水解酶(EC 3.2.1.3)

酸性 α -葡萄糖苷酶是从多糖、寡糖及麦芽糖分子的外部侧链切割下葡萄糖的酶。这个酶在 pH 4.0~5.0 范围内表现出最大活力, 这个酶位于溶酶体中。常在活检组织的组织匀浆中测定该酶水解麦芽糖形成葡萄糖的能力。为此, 在 0.05 毫升 0.5% 麦芽糖溶液, 0.05 毫升 0.1 M 乙酸缓冲液 (pH 4.0) 的混合液中加入 0.05 毫升 1% 肝组织匀浆(或 10% 肌肉匀浆), 37°C 保温 2 小时。对照试验不保温。加入等体积(0.05 毫升) 0.15 M Ba(OH)₂ 及 0.15 M ZnSO₄ 以终止反应。离心, 用葡萄糖氧化酶法测定上清液中所形成的葡萄糖量。计算每克组织 1 分钟内所形成的葡萄糖的 μM 数

以表示酸性 α -葡萄糖苷酶的活力。正常人的肝及肌肉中 α -葡萄糖苷酶的活力分别在 0.6~2.4 及 0.05~0.15 单位的范围内。肝、心及骨骼肌中如缺乏酸性 α -葡萄糖苷酶是 Pompe 氏症 (糖原积累症 II 型) 的特征。

所以, 为了诊断糖原积累症及确定其类型, 必须进行上述全部分析。

第二部分

生物活性肽、蛋白质及参与这些肽 及蛋白质代谢的酶的研究方法

根据血管紧张肽 I 的三肽测定人血清中羧基组 织蛋白酶(肽酰-二肽酶)活力的灵敏荧光法

Л. В. Павлихина, Ю. Е. Елисеева,
В. Ф. Позднев, В. Н. Орехович

羧基组织蛋白酶(肽酰-二肽酶, EC 3.4.15.1)是有机体组织中的血管活性肽(血管紧张肽 II 的拮抗物及血管舒缓激肽)含量的调节系统的成分之一。羧基组织蛋白酶首先由苏联医学科学院生化及医学化学研究所从公牛肾脏分离出来(Ю. Е. Елисеева, В. Н. Орехович, 1963)。根据我们的研究(Ю. Е. Елисеева, В. Н. Орехович, Л. В. Павлихина, Л. П. Алексеенко, 1970)及其它作者的资料(Yang et al., 1970), 肽酰-二肽酶不仅催化血管紧张肽 I 转变成血管紧张肽 II, 也破坏血管舒缓肽。

为了测定这个酶的活力, 提出了好几种方法。这些方法在鉴定由酶切割人工合成的底物时所形成的终产物的方式上有所区别。从我们的观点看来, 其中最简单并且很准确的方法是 Piquil-loud 等人(1970)提出的方法。根据这些研究工作者的工作, 我们研究了在人血清中测定羧基组织蛋白酶活力的条件。

方法原理

这个方法的基础是测定组氨酰-亮氨酸的荧光, 它是在羧基组

织蛋白酶作用下从血管紧张肽 I 即三肽(CBz 苯丙-组-亮)的C-末端切割下来的。组氨酰-亮氨酸(还有游离的组氨酸及N-端为组氨酸并带有游离 α -氨基的多肽)在碱性环境中与苯邻二醛形成稳定的荧光原。不含有游离氨基的组氨酸原始底物不能与二醛发生反应,因此也就不发生荧光。所以,可以根据被研究的溶液中荧光强度的增加来鉴定羧基组织蛋白酶的活力。

这个方法用起来很简单,只需要化很少的时间,从灵敏度上说也不次于放射性同位素法。只要 0.003 毫升血清就够用来进行测定。

试剂及材料

血清。用全血清作测定。可以将血清在冰冻状态贮存 7~10 天,羧基组织蛋白酶的活力几乎不变。

1mM 组氨酰-亮氨酸(原始标准溶液)。将 5.36 毫克组氨酰-亮氨酸溶解于 20 毫升重蒸馏过的用 0.2 N HCl 酸化的甲醇中(约用 0.2 毫升盐酸)。将溶液贮存在带磨口塞的瓶子中,放冰箱内。

苯邻二醛。将市售试剂用热庚烷或己烷重结晶。为此,称取二醛将它热水浴中溶于最少量的庚烷中。将溶液小心地倒出,与褐色的不溶解沉淀分开。将溶液放于冰箱中。将析出的结晶(亮柠檬黄色)吸滤出来,在 CaCl_2 上干燥后贮存于棕色瓶中,放冰箱内。临测定之前用重蒸甲醇配制成 1% 的溶液。

0.2 M Tris 溶液*。2.42 克 Tris 溶于 100 毫升重蒸馏水中,存于冰箱。

0.2 N HCl。

0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)。于 50 毫升 0.2 M Tris 溶液中加入 41~42 毫升 0.2 N HCl(用 pH 计控制),加重蒸馏水

* 所有水溶液都用重蒸馏水配制。试剂规格为化学纯或重结晶的。

至 200 毫升。在配制好的缓冲液中加入 NaCl 至浓度为 0.1 *M* (5.85 克/100 毫升)。存放于冰箱中不应超过 7 天。

2 *N* NaOH 溶液。

6 *N* HCl 溶液。

0.9% NaCl 溶液。

20% 三氯乙酸溶液。市售三氯乙酸含有能使荧光熄灭的杂质。为了除去这些杂质，将三氯乙酸用空气冷凝管在沙浴上蒸馏，收集沸点 195.5°C 的部分。

甲醇。在水浴中重蒸，收集沸点 64°C 的部分。

底物 *N*- α -苄氧基羰基-L-苯丙氨酰-L-组氨酰-L-亮氨酸 (缩写成 CBz-Phe-His-Leu)。

a) 合成：将 1 克组氨酰-亮氨酸及 1 克 NaHCO₃ 在磁力搅拌器搅拌及缓缓加热下 (~40°C) 溶于 10 毫升水中，溶液中加入 10 毫升异丙醇，冷却至 ~20°C，在搅拌下分批将 2 克 *N*-羟基丁二酰亚胺酯 *N*- α -苄氧基羰基苯丙氨酸溶液 (Anderson et al., 1964) 加入 10 毫升二氧己环中。将混合液在 ~20°C 放 10~12 小时后用水稀释到 100 毫升，在回旋蒸发器中低于 40°C 真空蒸发至 1/2 体积，将剩下的水溶液用乙酸乙酯抽提二次 (每次用 15 毫升)，将乙酸乙酯抽提液用 10 毫升 5% Na₂CO₃ 洗涤，将洗过的水溶液及碳酸钠萃取液合并，在气流中或真空中除去溶于水中的乙酸乙酯。然后，将溶液用 3 毫升冰乙酸酸化，用磁力搅拌器搅拌 1 小时，将形成的肽 (沉淀) 滤出，用 50 毫升水洗涤，将湿肽制剂与 20~25 毫升乙醇混合后加热至沸腾，再冷至 5~10°C，将沉淀过滤，用乙醇 (约 10 毫升)、乙醚洗涤。在硅胶-氯化钙真空干燥器中干燥。得到 1.7 克肽，熔点 214~216°C， $[\alpha]_D^{20}$ 15 \pm 1 (肽的 1% 的二甲酰替二甲胺溶液)。在 «Силуфол» 板上用乙腈:NH₃ (9:1) 层析时，R_f 值为 0.15。

b) 1 m M底物溶液。在 5.5 毫克 CBz-Phe-His-Leu 中加入 5 毫升甲醇及 1 毫升重蒸馏水, 溶解后, 用甲醇调至 10 毫升。

羧基组织蛋白酶活力的测定

将 0.1 毫升待测血清溶于 3.5 毫升 0.9% NaCl 溶液中, 在 1.8 毫升 0.05 M Tris-HCl 缓冲液中加入 0.1 毫升稀释血清, 将试样放于 38°C 恒温器中, 10 分钟后加入 0.1 毫升底物 (0.1 μ M)。保温 2 小时后, 加入 0.4 毫升 20% 三氯乙酸使反应停止。对照试验中必须在加入三氯乙酸后再加底物。离心 (2000g, 15 分钟), 除去蛋白质沉淀, 于 1.7 毫升离心液中加入 0.3 毫升 2 N NaOH (用于中和三氯乙酸), 及 1 毫升 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4)。试样总体积为 3 毫升。同时, 制备一个含有 10 nM Hris-Leu 的标准样品。为此, 将原始标准溶液用蒸馏水在容量瓶中稀释 100 倍 (至 0.01 μ M/毫升), 于 1 毫升稀释后的标准液中加入 2 毫升重蒸馏水, 以 3 毫升蒸馏水作为对照组。

为了进行荧光测量反应, 于样品中 (标准样品及待测样品) 加入 0.4 毫升 2 N NaOH 及 0.1 毫升 1% 苯邻二醛。从开始加入二醛时起 6 分钟后 (用秒表计时) 加入 0.2 毫升 6 N HCl (用于稳定荧光)。荧光的强度用荧光计测定。第一滤光片为 370 nm, 第二滤光片为 500 nm。样品中加入 HCl 后 1.5 小时内荧光是稳定的。

羧基组织蛋白酶活力以 1 毫升全血清中所含的酶在 1 分钟内能释放出来的组氨酰-亮氨酸的 nM 数表示。按下列公式计算酶活力:

$$\begin{aligned} A/\text{nM/ml/分钟} &= \frac{F_t}{F_s} \times 10 \times \frac{1}{120} \times \frac{2.4}{1.7} \div \frac{1}{360} \\ &= \frac{F_t}{F_s} \times 42.4 \end{aligned}$$

式中 A 为血清羧基组织蛋白酶的活力; F_t 为待测样品的荧光(减去对照试样的荧光后); F_s 为标准液的荧光(减去水的荧光后); 10 为标准样品中组氨酰-亮氨酸的含量 (nM); 120 为保温时间(分钟); 2.4 为被测样品的总体积; 1.7 为用于荧光反应的离心液体积; $\frac{1}{360}$ 为加于反应样品中的全血清的量(毫升)。

正常人血清中羧基组织蛋白酶的活力以 $nM/ml/\text{分钟}$ 表示时为 $14 \pm 0.5(M \pm m)$, $\sigma = \pm 3.7$ 。

方法的局限性

1. 应当考虑到某些药物(如利血平)会干扰测定,使对照及试验样品中的荧光增加。
2. 有铵盐存在时会形成蓝色沉淀。
3. 二价金属离子会熄灭荧光。
4. 不能用加有柠檬酸及草酸的血浆,因为有上述这些盐存在时,组织蛋白酶活力急剧下降。肝素不影响测定。

从蛋白质胶(生产人 γ -球蛋白时的废渣)

提取血管紧张肽原

Л. П. Алексеев

人及动物的肾脏把高度专一性的蛋白质水解酶(肾素)分泌到血液中(Haas et al., 1965)。这种酶能水解血管紧张肽原蛋白质中 10~11 氨基酸残基之间的肽键,同时分解出一个 10 肽——血管紧张肽 I,后者在羧基组织蛋白酶(Eliseeva et al., 1971)作用下,转变成 8 肽(血管紧张肽 II),它具有很高的生物活性,血管紧张肽 II 可刺激肾上腺分泌醛甾酮,并引起血管平滑肌收缩,动脉压

升高。已经证明,在某些病态高血压病人的血浆中肾素有明显的改变,在此基础上已研究出了鉴别诊断法(Методы дифференциальной диагностики)。可以在可疑的情况下检出肾上腺皮质瘤的激素活力——醛甾酮。

肾素的底物,血管紧张肽原是血清 α_2 -球蛋白组分中的一种蛋白质,分子量为 57000。要将它分离成为均一状态是十分困难的,因为要求有特殊的设备。然而,由于肾素具有高度专一性,所以没有特别的必要非把血管紧张肽原纯化到均一状态。酶制剂应用底物加以足够的富集,并且不应含有能破坏所产生的血管紧张肽的蛋白分解酶类等杂质。

为了测定病人血浆中肾素(及拟肾素),最好采用从人血清制备的底物,但是由于供体血价格十分昂贵,而用于制备的原料最好应当是尽可能的便宜。

综合了从不同材料分离肾素的底物的研究工作后,我们提出了一个从蛋白质胶分离血管紧张肽原制剂的方法。蛋白质胶是从人胎盘血工业制备 γ -球蛋白及血清清蛋白制剂时的废渣。根据 Skeggs 等人(1964)的方法进行分离。

血管紧张肽原的分离过程

将 1 公斤蛋白质胶 B-O(相当于 Cony 法中用乙醇分级分离血清时的组分 IV-4)与 30 升 0.9% NaCl 溶液搅匀至溶液(pH 4.5)中含有 10% 的蛋白质。将溶液冷却至 $6\sim 8^{\circ}\text{C}$, 用 2.5 N NaOH 将 pH 调到 6.5, 加碱时应逐滴加入,并不停地加以搅拌(每升约需加碱 $8\sim 10$ 毫升)。

第一次沉淀

向每升蛋白质溶液中加入 470 毫升饱和硫酸铵(4M)至溶液

中硫酸铵的浓度为 1.3 M 。1 小时后, 形成沉淀, 将悬浮液经折叠滤纸过滤过夜, 弃去沉淀, 每升滤液中加入 600 毫升饱和硫酸铵至浓度为 2.3 M , 将悬浮液经折叠滤纸过滤过夜, 弃去滤液, 将沉淀转移到布氏漏斗上, 减压抽滤除去剩下的滤液。将紧密的沉淀转移到火棉胶透析口袋中, 对流动自来水透析一夜。合并所得到的溶液, 测量它的体积及蛋白质浓度(按 Lowry 和按 280 nm 吸收, 得到的结果相似)。然后用冷蒸馏水将溶液稀释到蛋白质的浓度为 5% 。

第二次沉淀

1 升溶液中加入 613 毫升饱和硫酸铵溶液至硫酸铵浓度达到 1.5 M 。经折叠滤纸过滤一夜后分离出沉淀。滤液中加入硫酸铵饱和溶液(按每升中加入 460 毫升计算), 至浓度为 2.3 M , 过滤收集沉淀。用布氏漏斗抽滤(冷处)使沉淀变得紧密, 所得的沉淀为绿色。

用 EDTA 碱处理使血管紧张肽酶失活

将沉淀溶于蒸馏水中使蛋白质浓度为 5% , 这时的溶液为黄绿色。将溶液加热至 25°C , 按每升 26 克的量加入 EDTA-Na_2 。

逐滴加入 2.5 N NaOH 溶液, 每升加 20 毫升, 将溶液的 pH 调到 8, 于室温中放置 1 小时后将溶液冷却至 8°C , 逐滴加入 2.5 N HCl (每升约加 40 毫升), 将 pH 调到 5.35。

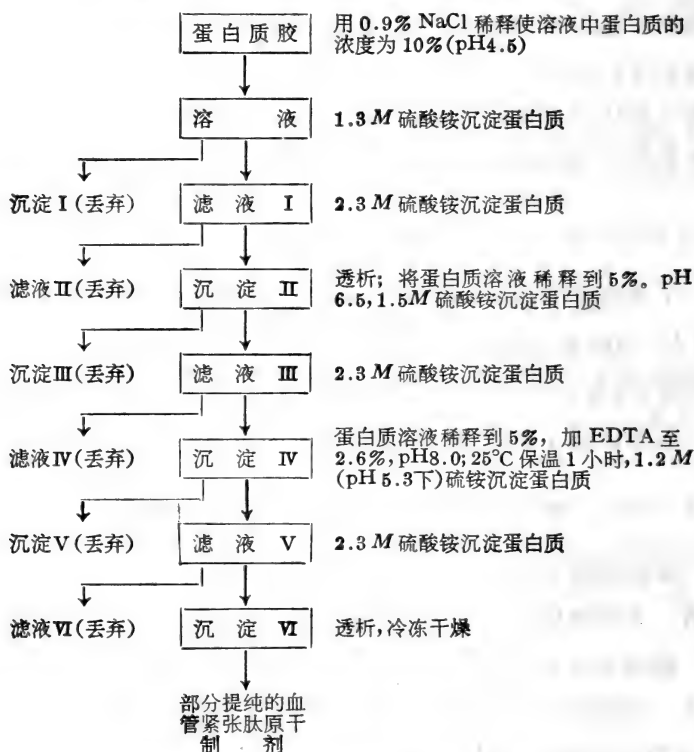
第三次沉淀

每升所得的溶液中加入 400 毫升硫酸铵饱和溶液使硫酸铵的浓度达到 1.2 M , 过滤分离出沉淀, 在每升滤液中加入 670 毫升饱和硫酸铵溶液使硫酸铵的浓度达到 2.3 M 。

收集沉淀, 抽滤以使沉淀紧密, 对流动的自来水进行透析(二昼夜), 然后对 0.9% NaCl 溶液进行透析(二昼夜)。将透析后所

得的溶液冷冻干燥,得到的是部分纯化的血管紧张肽原的干制剂。
此分离法可以图解如下。

图解III 从蛋白质胶分离血管紧张肽原



制品中血管紧张肽原浓度的测定

生物学测定

将 0.5 毫升血管紧张肽原制品 (20 毫克/毫升) 及 0.5 毫升肾素 (25 微克/毫升) [都溶于含有 0.5 毫克/毫升 EDTA- Na_2 的 0.01 M 磷酸钠缓冲液中 (pH 6.5)] 37°C 保温 1 小时。于沸水浴中加热 3 分钟沉淀蛋白质, 然后离心除去蛋白质。将含有血管紧张肽 I 的无蛋白质离心液 0.1~0.2 毫升注射到用于生物测定试验的大

白鼠身上。将试样用 0.9% NaCl 溶液稀释至 2.5 和 10 倍。

对制剂中血管紧张肽原含量进行生物学测定时，是测量切除肾管后的大白鼠的动脉压的增加值。大白鼠肾管的切除在测定之前 18~20 小时进行。用戊巴比妥钠生理盐水溶液作为试验动物的麻醉剂，按每 100 克体重 5 毫克计算作静脉注射。临实验之前切断动物的迷走神经，在颈动脉上插上一个套管，将套管联在水银压力计上。剥出股静脉，插上一个套管以供注射之用，从静脉注射缬氨酰-5-血管紧张肽 II 以作为对照，因为血管紧张肽原的含量习惯上是用血管紧张肽单位表示的。

每 0.1 毫升标准溶液中应当含有 2.5~16.0ng 血管紧张肽 II。为了防止形成血栓，与带有压力计的颈动脉相连的聚乙烯套管中装上 0.9% NaCl 溶液，实验开始前，再将肝素注射到股静脉中，在两次标准溶液注射之间将试样注射进去。不能注射带有钾离子的试样，因为钾离子本身会引起动脉压升高。

检出制剂中有血管紧张肽酶的试验 将 100ng 血管紧张肽 II 与 10 毫克血管紧张肽原制剂在 1 毫升磷酸钠缓冲液中 (pH 6.5) 保温 1, 4, 20 及 48 小时，这时蛋白质发生热变性，除去变性蛋白后，将试样注射到大鼠身上，以测定所形成的血管紧张肽的含量。

化 学 测 定

在一个特殊结构的反应器 (反应柱) (图 10) 中放上 2 毫升血管紧张肽原 (含有 200~300 毫克干物质)，100 微克肾素 (溶于 0.01 M pH 6.5 的磷酸钠缓冲液中) 及 1 毫升用这一缓冲液洗涤过的潮湿的 Dowex 50×2 离子交换树脂。把反应柱水平地放在一个振荡器 (шуттитель-аппарат) 中，振荡 4 小时。保温完毕后将反应柱垂直地放在一个架子上。树脂即下沉并将柱的狭窄部位塞满。柱子上装一个带乙酸铵缓冲液 (pH 6.7) 的贮液瓶，让 10~15 毫升缓

冲液通过柱子,从柱子上冲洗掉未被结合上的蛋白质。进一步,将树脂用5毫升10%乙酸溶液及100毫升水洗涤至中性反应。

由肾素催化的血管紧张肽原水解而形成的血管紧张肽被吸附于树脂上。用5毫升0.2M二乙胺溶液将它从柱子上洗脱下来。将洗脱液在真空中冷冻干燥,用1毫升96%乙醇洗涤,再把它真空干燥以除去二乙胺。

将试样点在薄层层析硅凝胶(KCK)薄板上,在下列系统中进行分离:2-丁醇—3%铵水(25:1,体积比)及正丁醇—氨—水(120:7:7,体积比)。按Паули法使形成的血管紧张肽显色(肽中组氨酸残基的含量)。

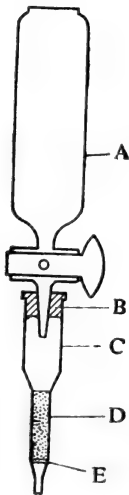


图 10 柱形反应器。A——贮洗脱液的漏斗; B——磨口柱子; C——柱子上部(高3厘米,直径15毫米); D——柱子下部(高3厘米,直径5毫米),装有Dowex 50×2树脂; E——滤片

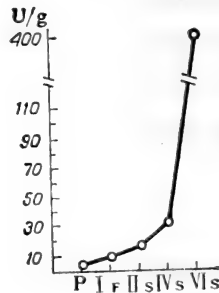


图 11 不同纯化阶段时制剂中血管紧张肽原的含量(每克所含有的Goldblatt单位数)。P——蛋白质胶; I_F——滤出液 I; II_S, IV_S, VI_S——用硫酸连续盐析出来的蛋白质沉淀(解释见正文)

纵座标——血管紧张肽原的活力(单位/克); 横座标——各组分的符号

方法的评价

从1公斤蛋白质胶制得50—55克冻干粉,每克蛋白质约含有血管紧张肽原400Goldblatt大白鼠单位。给大鼠注射其作用相当于0.33微克血管紧张肽II的制剂时所引起的动脉压增加值定为一个Goldblatt单位(CIBA)。最后一步纯化后(得到沉淀),由于除去了血管紧张肽酶后,制剂中的血管紧张肽原的含量显著上升(图11)。

人血清(血浆)中激肽释放酶和 激肽释放酶原的定量测定

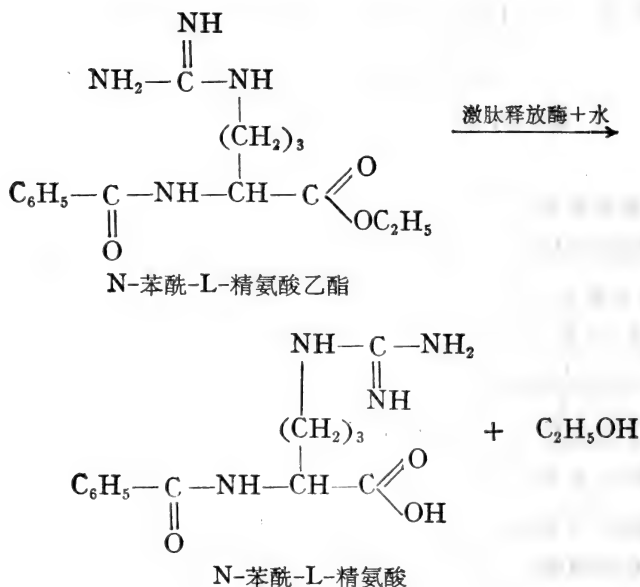
T. C. Пасхина, A. B. Куринская

血浆激肽释放酶(EC 3.4.4.21)是有高度底物专一性的与胰蛋白酶相类似的《丝氨酸》*蛋白酶。它催化生物体内激肽原酶反应,即从糖蛋白性质的无活力的前体物激肽原上切除一个9肽(舒缓激肽)或它的N-末端的同系物的反应。这一反应是在循环的血液中、在毛细血管周围的空间中、分泌的腺体中、肾脏及某些其它器官中形成游离的激肽的基础。这个反应决定着有机体中一系列重要的生理功能,例如:微循环的调节,局部血液循环的调节;血压水平的调节等等(T. C. Пасхина, 1966, 1972)。激肽原酶的激活作用及游离激肽的形成见于许多生理的(新生儿呼吸的形成等)及病理的状态中,如发炎(包括不同原因的胰腺炎,关节炎),支气管哮喘等。但是要直接控制有机体中激肽形成的速度是十分困难的。评价激肽系统的状态的方法之一是测定血清中激肽释放酶的活力及激肽释放酶原的含量。

* 属于水解酶类,酶的活力中心中含有丝氨酸残基。

方 法 原 理

早先曾经有人(Т. С. Пасхина, Г. А. Яровая, 1970, Т. С. Пасхина и др., 1973)建议用柱层析法来测定激肽释放酶及其前体。这个方法的根据是激肽释放酶具有的《阳离子》性质。由于它在 pH 7.0 及低离子强度下不能吸附于 DEAE-Sephadex A-50 上, 所以可以根据 N-苯酰-L-精氨酸乙酯中的酯键水解的速度(如下图)用分光光度法对不被吸附的血清组分进行测定。



下面叙述一个不需要层析柱, 只需要 0.25 毫升(而不是 1 毫升)血清的改良简化样品检测法。对制备含有激肽释放酶及其前体的组分的方法所作的某些必要的修改对分析病人血清的样品是特别重要的。

试剂及仪器

DEAE-Sephadex A-50 (瑞典«Pharmacia»)或 DEAE-Mo-
лселект A-50 (匈牙利)。

纯胰蛋白酶制剂, 比活力 16—18 单位。

卵类粘蛋白。

胰蛋白酶-Sephazym (瑞典«Pharmacia») 或固相胰蛋白酶
制剂。

N-苯酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE·HCl)。

用 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 平衡过的 DEAE-Sephadex
A-50 稠的悬浮液, 按照公司的说明制备: 将 10 克干 Sephadex 浸
泡于室温的蒸馏水中 24 小时以使它膨胀, 然后在布氏漏斗上用
0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 Sephadex。10 克干重的 Sepha-
dex 足够用于 100 次分析。

0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0)。

含有 0.05 M NaCl 的 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0)。

0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 8.0)。

0.1% 胰蛋白酶 (溶于 0.002 N HCl 中)。

2% 卵类粘蛋白 [溶于 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中]。

1.5 mM BAEE 溶液。将 6.2 毫克 BAEE 溶于 12 毫升 0.1 M
磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中。

分析过程

激肽释放酶及激肽释放酶原的测定包括两个基本的步骤: 第
一步, 在 pH 7.0 时不被 DEAE-Sephadex A-50 吸附的血清蛋白
组分的制备; 第二步, 根据 BAEE 水解的速度用分光光度法对滤
液中激肽释放酶及激肽释放酶原本身活力的测定 (Т. С. Пасхина

и др., 1968)。取血及血液贮存的条件对分析的结果有影响, 所以应用聚硅酮处理过的针头取血, 并用聚乙烯试管或用聚硅酮处理过的试管收集血液。制备血浆时, 将 9 体积血液与 1 体积 4% 柠檬酸钠溶液混匀后在 1500g 离心 15 分钟。

不被吸附的组分的制备

将 0.25 毫升血清(浆)用 0.02 M 磷酸缓冲液(pH 7.0)稀释 3 倍后加入 3 毫升用同样缓冲液平衡过的 DEAE-Sephadex A-50 稠的悬浮液。用一根细玻璃棒将混合液小心地搅 10 分钟, 然后加入含有 0.05 M NaCl 的 3 毫升 0.02 M 磷酸缓冲液(pH 7.0), 再搅拌 2 分钟后将悬浮液转移到玻璃滤器 No.1 (ДГ-29) 上, 减压过滤。

将滤液定量地转移到一个 50 毫升的刻度试管中, 用 0.02 M 磷酸缓冲液调到刻度。

激肽释放酶活力的测定

从 5 毫升滤液中取出 1 毫升, 加入 1 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液(pH 8.0) 及 1 毫升 1.5 mM BAEE 溶液。在对照组试样中加入 2 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液(pH 8.0) 及 1 毫升 1.5 mM BAEE 溶液(pH 8.0 时, 试样中的酯便自发水解)。用分光光度计波长 253 nm 25°C 以对照组试样为空白测定 15 分钟内试样的光密度的增加 ($\Delta D_{253}^{15 \text{ 分钟}}$), 每隔 5 分钟读数一次。

激肽释放酶原含量的测定

取 1 毫升滤液, 加入 0.8 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液(pH 8.0) 及 0.1 毫升 0.1% 胰蛋白酶的 0.002 N HCl 溶液, 将试样在 25°C 放置 2 分钟, 然后加入 0.1 毫升 2% 卵类粘蛋白[溶于 0.1 M 磷酸缓

冲液(pH8.0)]以使胰蛋白酶失活, 15 分钟后, 在试样中加入 1 毫升 1.5 m M BAEE 溶液, 根据在 10~15 分钟内波长 253 nm 光密度的增加测量试样中酯酶的活力, 每隔 3~5 分钟读数一次。

激肽释放酶原的活化作用也可用固定化胰蛋白酶(胰蛋白酶-Sephazym), 或用在实验室制备的固定化胰蛋白酶来实现(见 В·Ф. Нартикова и др., 179 页)。于 1 毫升滤液中加入 0.3~0.5 毫升 Sephazym-胰蛋白酶(3~3.5 单位)稠的悬浮液(悬浮于 pH 4.2 的 1 mM 乙酸缓冲液中)及 0.7~0.5 毫升 0.1 M 磷酸缓冲液(pH8.0), 小心地混匀, 于 25°C 放 20 分钟后, 离心, 或在玻璃滤器 No.1 上过滤除去 Sephazym, 于试样中加入 1 毫升 1.5 mM BAEE 溶液, 按前面所述测量波长 253nm 下酯水解的速度。

用胰蛋白酶处理后, 不被 DEAE-Sephadex 吸附的组分(按本方法制备)的酶性质及生物学活性的研究结果证实了这样的看法(Т. С. Пасхина и др., 1973)即: 该组分中的精氨酸的酯酶活力是由激肽释放酶所决定的, 活化后的不被吸附组分的抑制剂光谱与纯化后的激肽释放酶制剂的抑制剂光谱是一致的。

· 活力的计算

在标准条件下 1 分钟内能催化 BAEE 酯水解而释放出 $1 \mu M$ 的苯酰-精氨酸的酶量定为激肽释放酶的一个活力单位(U)。激肽释放酶及激肽释放酶原的含量可用 1 毫升血清中的所含的 mU 数表示, 并按下面的公式计算:

$$\frac{\Delta D_{253}^{11} \text{ 分钟} \times 3 \times 5 \times 1000}{15 \times 1.1 \times 0.25} = \Delta D_{253}^{11} \text{ 分钟} \times 3636$$

= 1 毫升血清中激肽释放酶的 mU 数

式中 1.1——相当于 1 毫升试样中形成 $1 \mu M$ 苯酰-精氨酸的 253 nm 光密度的增加值; 3——比色杯中试样的体积(毫升); 5——滤

液的体积(毫升); 0.25——用于分析的血清的体积(毫升); 15——反应进行的时间(分钟)。

方法的应用

应用这个方法后我们发现: 健康人血清中几乎没有游离的激肽释放酶。可能这是由于健康人血清中有这种酶的抑制剂存在的缘故。健康人血清中激肽释放酶活力的变动范围在 $0 \sim 10 \text{ mU/毫升}$ ($\Delta D_{415}^{\frac{5}{\text{分钟}}} = 0.001 \sim 0.003$) 之间, 这些数值在方法误差范围内, 只有在某些病理状态下才能得到了可靠的数据(Т. С. Пасхина и др., 1972)。健康人血清中激肽释放酶原的含量为 $369 \pm 59 \text{ mU/毫升}$ 。在柠檬酸血浆中为 $318 \pm 57 \text{ mU/毫升}$ 。肝脏病人(肝硬变、脂肪性营养不良, 肝炎)的血清中激肽释放酶原的含量减少 $20 \sim 60\%$ (Т. С. Пасхина и др., 1974), 这证实了以前得到的有关在肝脏中激肽释放酶原合成的观察(Wang et al., 1972)。在烧伤休克时也发现有激肽释放酶原含量的降低。在肾综合症时发现激肽释放酶原含量的升高($464 \pm 84 \text{ mU/毫升}$), 可以认为这是由于在患这种疾病时肝蛋白质合成功能的加强是用来补偿随尿排出的大量血液蛋白的损失。

从人血清制备部分纯化的激肽释放酶制剂

А. В. Кринская, Т. С. Пасхина

激肽释放酶(EC 3.4.4.21, 有关这类酶的更为详细的叙述见 145 页)在血浆中以无活力的前体形式存在, 它具有很小的不均一性。许多作者已从人血清制得纯化的激肽释放酶制剂(А. Л. Лауфер и др., 1969; Colman et al., 1969 等)。这个酶在血浆中的含量很低, 具有很小的不均一性, 高度的不稳定性以及很易与

其它蛋白质形成复合物的特性，这些都是要制备高纯度的血浆激肽释放酶制剂是比较困难的原因。

方 法 原 理

这个方法是基于血浆激肽释放酶的基本特性 ($pI \sim 8.5$)。由于这些特性，这个酶在 $pH 7.0$ 及低离子强度时不能被 DEAE-Sephadex A-50 吸附，而能与 SE-Sephadex K-50 牢固地结合。这样就可以将它与其它胰蛋白酶相类似的血清蛋白酶及非激肽释放酶的 BAEE-酯酶彼此分开。下一步是通过 Sephadex G-200 过滤，可以把激肽释放酶本身与其低活力高分子复合物分开。得到的激肽释放酶制品具有血管松弛作用，激肽原酶的作用及精氨酸-酯酶的作用。后面两个性质是激肽释放酶测定法的基础。

激肽释放酶的 BAEE-酯酶活力测定

激肽释放酶的 BAEE-酯酶活力可用 Trautschold 等人的改良法加以测定 (Trautschold, Werle, 1961; Т. С. Пасхина и др., 1968)。这个方法是根据从 N-苯酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE) 上切下苯酰-精氨酸 (BA) 的速度并用分光光度法加以测量 (见 Т. С. Пасхина, А. В. Кринская, 145 页)。

试 剂

0.05 M Tris-HCl 缓冲液 ($pH 8.0$)。

1.5 mM BAEE-HCl 溶液 (6.2 毫克 BAEE-HCl 溶于 12 毫升 $pH 8.0$ 缓冲液中，试剂在测定酶活力的当天制备)。

分 析 过 程

将酶液 (100~150 mU/0.1~0.3 毫升) 加于 1 毫升 BAEE 溶液中，用 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 ($pH 8.0$) 将体积调至 3 毫升。

反应在分光光度计的恒温比色杯中进行(25°C)。记录波长 253 nm 光密度的增加值, 根据酶的活力不同, 每隔 1~5 分钟读数一次。以试样中 BAEE 的自发水解作为空白, 根据样品中 1 分钟内光密度的增加值按下列公式计算酶活力:

$$\frac{\Delta D_{253}^{1 \text{ 分钟}} \times 3}{1.1} = \Delta D_{253}^{1 \text{ 分钟}} \times 2.73 = U^* / \text{样品}$$

式中 $\Delta D_{253}^{1 \text{ 分钟}}$ ——每毫升样品 1 分钟内 253 nm 光密度值的增加;
3——比色杯中试样的体积(毫升); 1.1——1 毫升试样中从 BAEE 形成 $1 \mu M$ BA 时 253 nm 光密度的增加。

酶的比活力(单位/毫克)按下列公式计算:

$$\frac{\Delta D_{253}^{1 \text{ 分钟}} \times 2.73}{C}$$

式中 C ——试样中蛋白质的含量(毫克)。

血清中原有的 BAEE-酯酶活力按下列方法测定: 将 0.03 毫升血清用 0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)稀释到 2 毫升, 加入 1 毫升 1.5 mM BAEE。按上述方法测定 BAEE 酯酶活力, 测定持续 30 分钟, 每隔 5 分钟读数一次, 血清中的酶活力(单位/毫升)按下列公式计算:

$$\frac{\Delta D_{253}^{30 \text{ 分钟}} \times 3}{1.1 \times 0.03 \times 30} = \Delta D_{253}^{30 \text{ 分钟}} \times 3.03$$

式中 $\Delta D_{253}^{30 \text{ 分钟}}$ ——1 毫升试样中 30 分钟内 253 nm 光密度的增加值; 3——试样的体积(毫升); 0.03——用于分析的血清量(毫升); 1.1——1 毫升试样中从 BAEE 形成 $1 \mu M$ BA 时 253 nm 光密度的增加值; 30——反应时间(分钟)。

血清在临测定激肽释放酶的 BAEE-酯酶活力之前加以稀释, 以防止稀释后血清中的 BAEE-酯酶的活化作用。

* U——在标准条件下 1 分钟内分解 $1 \mu M$ 的底物的酶活力为一个国际单位。

激肽释放酶制剂中激肽原酶活力的测定

纯化后的激肽释放酶制剂中的激肽原酶活力可根据与激肽释放酶保温 1, 2 及 5 分钟后, 从激肽原切割下来的舒缓激肽的量来测定。用 61°C 加热并对 0.9% NaCl 溶液透析后的豚鼠血清作为激肽原酶。

试 剂

舒缓激肽-三乙酸酯溶液, 浓度为每毫升 0.004 *N* 草酸溶液中含有 200 ng, 按下法制备 (Т. С. Пасхина и др., 1968): 将 1 毫克舒缓激肽-三乙酸酯在研钵中与 99 毫克 NaCl 仔细地研碎, 将 1 毫克这样的制品 (10 微克舒缓激肽) 溶于 50 毫升 0.004 *N* 草酸溶液中。草酸可降低舒缓激肽在玻璃上的吸附。舒缓激肽以冰冻状态贮存于 -20°C。

0.1 *M* Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6), 含有 1 *m* 8-羟基喹啉。

10% 三氯乙酸溶液。

加热后的豚鼠血清 (激肽原的来源): 将血清在 61°C 水浴中加热 1 小时后对 0.9% NaCl 溶液透析 24 小时。

分 析 过 程

在 1 毫升加热后的豚鼠血清中加入 1 毫升激肽释放酶溶液及 1 毫升含有 8-羟基喹啉的 0.1 *M* Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 作为激肽酶的抑制剂, 37°C 保温。经 1, 2, 5 分钟后取出 0.06 毫升试样, 放入含有 0.4 毫升 10% 三氯乙酸溶液的试管中, 然后加 ~0.55 毫升 0.5 *N* NaOH 溶液中和试样, 再用 0.004 *N* 草酸溶液将试样调到 2 毫升。根据离体大白鼠子宫角的收缩测定试样中舒缓激肽的含量 (Т. С. Пасхина и др., 1968)。

前激肽释放酶(激肽释放酶原)的激活作用

激肽释放酶在血清中是以无活力的前体——激肽释放酶原而存在的。所以,为了在纯化的第一阶段测定它的酶活力时,需要预先用胰蛋白酶将它激活。

试 剂

0.1%胰蛋白酶的0.002 *N* HCl 溶液(结晶胰蛋白酶,按BAEE的分解计算比活力为16~20单位/毫克)。

0.2%卵类粘蛋白,溶于0.05 *M* Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中。

分 析 过 程

于1毫升前激肽释放酶的样品中加入0.8毫升0.05 *M* Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)及0.1毫升胰蛋白酶的0.002 *N* HCl 溶液。将试样在25°C放置2分钟,加入0.1毫升卵类粘蛋白以抑制胰蛋白酶的活力。15分钟后按前面叙述的方法测定BAEE-酯酶及激肽原酶活力。

纯激肽释放酶制剂的制备

用A型, B型, AB型及O型供血者的混合血清作为分离激肽释放酶的原料。

第一步,制备血清。将供血者的血液收集于干燥容器中,离心除去形成的血凝块(30分钟,1500 g)。

第二步,将人的全血清用0.02 *M* 磷酸缓冲液(pH 7.0)稀释3倍,上DEAE-Sephadex A-50柱(5×40厘米,柱子预先用同样缓冲液平衡),用0.02 *M* 磷酸缓冲液(pH 7.0)洗涤柱子,收集不被

吸附的组分, 此组分中含有激肽释放酶原及主要为 γ -球蛋白的杂蛋白。缓冲液的流速每小时 150 毫升, 组分的体积为 200 毫升, 根据 280 nm 吸收值测定组分中蛋白质的浓度, 同时测定激活后的激肽释放酶原的 BAEE-酯酶活力及激肽原酶活力 (图 12, A)。把含有激肽释放酶原的组分合并, 用硫酸铵 (0.5 饱和度) 沉淀蛋白质。将沉淀溶于最小体积的 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 6.4) 中, 再用 Sephadex G-25 柱脱去硫酸铵, 柱子先用 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 6.4) 加以平衡。用相同缓冲液进行洗脱。

第三步, 将上一步所得的有活力的组分上 SE-Sephadex K-50 柱 (1.5 × 30 厘米), 柱子先用 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 6.4) 加以平衡。将蛋白质溶液渗入柱子中以后, 用 200~250 毫升起始缓冲液洗柱以除去不被吸附的蛋白质, 用 pH 及离子强度两种梯度洗脱使蛋白质解吸。用两个具有相同截面积的容器建立梯度: 混合瓶中—150 毫升 0.02 M 磷酸缓冲液 (pH 6.4), 供液瓶中—150 毫升含有 0.3 M NaCl 的 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 8.0)。缓冲液的流速每小时 10 毫升。每个组分的体积为 10 毫升。测定每个组分中 BAEE-酯酶及激肽原酶的活力 (见图 12, B)。在所有的组分中都可以见到酯酶的活力, 但激肽原酶的活力只见于 pH ~ 6.9 及 ~ 0.2 M NaCl 的组分中。将具有激肽原酶活力的组分合并后对重蒸水透析, 冷冻干燥。

第四步, 将第三步得到的激肽释放酶冻干制剂溶解在 1 毫升含有 0.2 M NaCl 的 0.05 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 上 Sephadex G-200 柱 (1 × 100 厘米), 柱子预先用相同的缓冲液加以平衡, 等到蛋白质渗入后, 用含有 0.2 M NaCl 的 0.05 M 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤, 流速每小时 5 毫升, 每个组分的体积约为 2 毫升, 收集具有最大的 BAEE-酯酶及激肽原酶活力的组分, 这些组分位于洗脱图上蛋白质峰的右肩上 (见图 12C) ($V_e = 34 \sim 35$ 毫升, 柱子的

$V_0=25$ 毫升)。将收集到的组分对蒸馏水透析 3 小时后冷冻干燥。活力较低的组分($V_e=28\sim33$ 毫升及 $36\sim37$ 毫升)可能是激肽释放酶与其它蛋白质的复合物,对这些组分应作进一步的纯化。

表 20 中提供了一个从人血清纯化激肽释放酶的典型实验的结果。

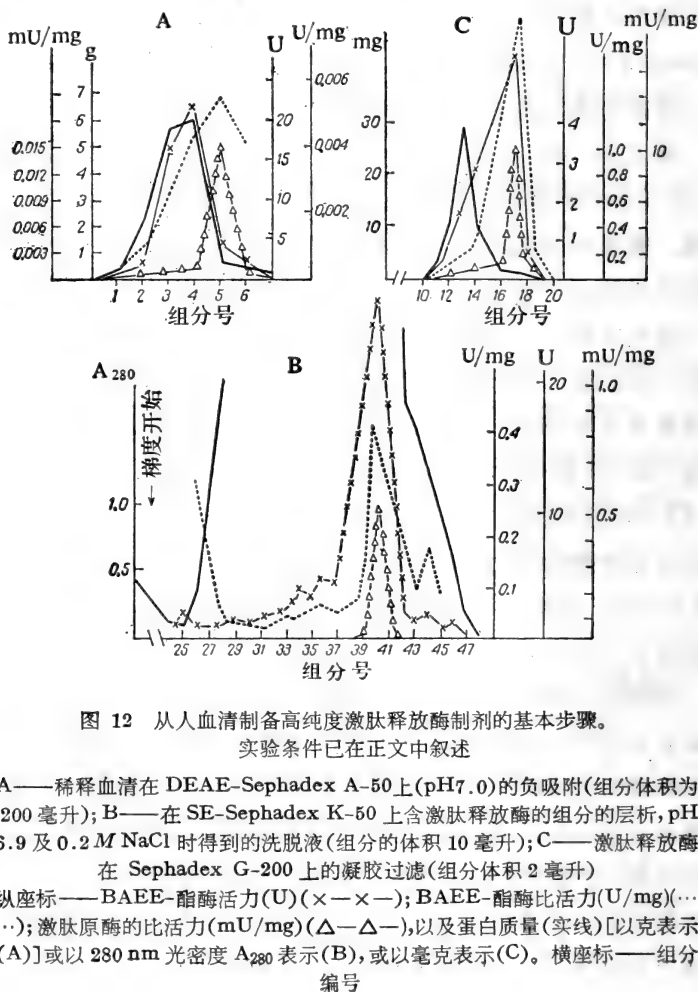


表 20 从血清纯化激肽释放酶制剂

纯化步骤	组分鉴定			纯化程度		产率(占总活力%)		激肽原酶活力与酯酶活力的比例 $\times 10^{-3}$			
	体积 (ml)	蛋白质 (g)	BAEE 酯酶活力		按激肽原酶活力	按BAEE-酯酶活力	按激肽原酶活力				
			总活力(U)	比活力 U/mg							
I. 血清	200	15.25	46	0.003	—	—	1	100			
II. DEAE-Sephadex A-50 上的负吸附(pH7.0)	1200	2.0	40	0.02	(20**)	0.01	1	6.6	100	87	0.5
III. SE-Sephadex k-50 上的吸附($\sim 0.2 M$ NaCl, pH ~ 6.9 洗脱液)	10	0.065	26	0.4	32.5	0.5	50	133	162	56	1.25
IV. Sephadex G-200凝胶过滤:											
Ve=28~33毫升	6	0.018	12.08	0.67	8	0.4	44	233	40	26	0.6
Ve=34~35毫升	2	0.002	4.0	16.88	20	29.3	1000	666	100	146.5	5.0
Ve=36~37毫升	2	0.001	0.8	0.8	1.3	1.3	130	266	6.5	1.7	1.5

* mU 激肽原酶活力相当于在标准条件下 1 分钟内释放出 1.068 克(1nM)舒缓激肽或 1.198 毫克(1nM)赖氨酸舒缓激肽的酶量 (Trautshold, Werle, 1970)。

** 由于有干扰测定的杂蛋白存在,而使活力的数值降低。

激肽释放酶制剂的鉴定

所得的激肽释放酶制剂用聚丙烯酰胺凝胶电泳时在 γ -球蛋白的位置上形成一条带。根据 Sephadex G-200 凝胶过滤的资料计算,纯化后的激肽释放酶的分子量约为 100000。酶制剂中不含有血纤维蛋白水解活力及酪蛋白水解活力,不能将血纤维蛋白原转变成血纤维蛋白。实际上也没有酰胺酶活力。不分解赖氨酸酯。高纯度的激肽释放酶制品不含激肽释放酶的抑制剂及激活剂,受 $10^{-4} M$ 二异丙基氟磷酸酯, Trasylol* ($K_i = 1 \times 10^{-10} M$), 大豆荚果胰蛋白酶抑制剂 ($K_i = 1 \times 10^{-10} M$) 的抑制 (Т. С. Пасхина и др., 1975)。卵类粘蛋白、肝素、兔血清的胰蛋白酶耐热及耐酸抑制剂 (В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина, 1969) 不抑制酶制剂的激肽原酶及酯酶活力,换算成 BAEE-酯酶活力单位后激肽释放酶制剂的激肽原酶活力比胰蛋白酶的活力要高二个数量级。激肽释放酶冻干制剂中约含有 80% 的蛋白质 (按 Lowry), 20% 的活化的酶 (按 Trasylol 滴定的资料), 在 $4^{\circ}C$ 时,几个月内有活力。

所得的激肽释放酶制剂在“功能”上是纯的,在模型研究中可用纯的底物来研究激肽原酶反应的机理,也可用来研究激肽系统与血液凝固体系及血纤维蛋白溶解作用之间的关系 (体内及体外)。

从兔血清制备高度纯化的激肽原

Т. П. Егорова, Л. Г. Макевнина,
Е. Б. Россинская., Т. С. Пасхина

激肽原是血管活性肽—激肽的无活性前体物存在于人及哺乳

* 一种胰蛋白酶抑制剂的商品名,德国拜耳药厂出品——译者注。

类的血浆中。每 100 毫升血浆含有 20~30 毫克激肽原。它是含糖量很高的酸性 α_1 -糖蛋白, 它的分子量为 50000。在血浆中激肽原可以以几种不同的分子形式存在, 其中包括分子量为 100000~200000 的高分子量激肽原 (不同生物中占 5~15%) (Т. С. Пасхина, 1972)。

激肽原是专一的蛋白酶 (激肽释放酶) 及非专一的蛋白酶 (胰蛋白酶) 的底物, 这些蛋白酶从激肽原分解出一个 9 肽-血管舒缓激肽或 10 肽-赖氨酰舒缓激肽。图 13 所示的是激肽原的假定结构及被分解的键的位置的图解。血浆激肽释放酶及胰蛋白酶从激肽原切下一个血管舒缓激肽, 胰激肽释放酶则从激肽原切下一个赖氨酰舒缓激肽)。

制备高度纯化的激肽原制剂对于研究激肽原酶的反应机理是必不可少的。分离激肽原是一个困难的任务, 因为它在血浆中的含量较低, 并且在分离过程中有被血浆激肽释放酶分解的可能。

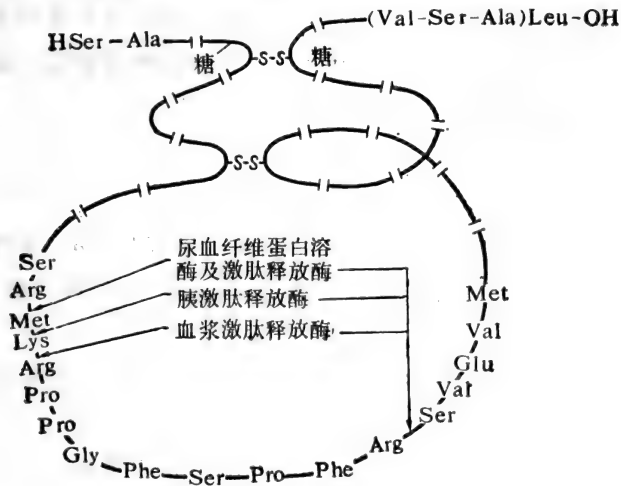


图 13 公牛激肽原的假定结构图解 (Ямафудзи, Идзумия, 1971)
箭头指的是被激肽原酶所分解的键

已经发表了几种分离激肽原的方法，其中也包括从人及公牛血浆中分离的方法 (Habermann, 1970)。下面叙述从兔血浆分离激肽原的方法。这是一个早就提出了的方法的改良法 (Т. С. Пасхина, Т. П. Егорова, 1966)。

这个方法是根据激肽原是等电点 (pI 3.15~3.5) 较低的蛋白质，所以在 pH 7.2 及高离子强度时能选择性地与 DEAE-Sephadex A-50 相结合 (Т. Л. Егорова, Т. С. Пасхина, 1967)。用羟基磷灰石吸附层析及 Sephadex G-200 凝胶过滤可将激肽原与其它酸性蛋白相分离。用聚丙烯酰胺凝胶制备电泳作最后一步分离时可以达到最大限度的纯化。

激肽原含量的测定

血浆中及激肽原分离的各阶段的各组分中激肽原含的量是根据被研究的血浆及组分用胰蛋白酶处理后所形成的舒缓激肽的量来测定的，并用相对单位 (U) 表示它的活力。1 个单位相当于切下 1 微克血管舒缓激肽的活力。为了使激肽酶及胰蛋白酶抑制剂失活，将血浆在酸性环境中加热。

试 剂

0.1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6)，含有 3 mM 8-羟基喹啉。将 4.3 毫克 8-羟基喹啉溶于 10 毫升 0.1 M Tris-HCl 缓冲液中 (pH 7.8)。

0.1% 胰蛋白酶溶液，溶于 0.25 mM HCl 中，应采用不含糜蛋白酶的胰蛋白酶制剂。

0.2 mM 血管舒缓激肽溶液，溶于 4 mM 草酸中。10 微克血管舒缓激肽 (人工合成的) 溶于 50 毫升草酸中。

测定过程

将 0.1 毫升血浆加到 1 毫升 0.2% 乙酸中, 在沸水浴中加热 30 分钟, 将样品冷却, 用 0.5 *N* NaOH 中和至 pH 7.2~7.4 (按溴百里酚蓝显绿色), 定量地转移到塑料试管中, 加入 1 毫升 0.1 *M* Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6), 0.2 毫升胰蛋白酶溶液 (200 微克), 37°C 保温 30 分钟, 加入 0.5 毫升 20% 三氯乙酸以停止激肽原酶反应。离心, 将离心液用 0.5 *N* NaOH 中和至 pH 7.0, 在容量瓶中用 4 *mM* 草酸将体积调到 5 毫升, 用前面叙述过的生物学法, 用离体大白鼠子宫角测定血管舒缓激肽的含量 (Т. С. Пасхина и др., 1968)。

测定不同纯化阶段的蛋白质组分中的激肽原是用未经变性的蛋白质进行的。于 0.2 毫升收集在塑料试管的组分中加入 0.6 毫升含有 3 *mM* 8-羟基喹啉的 0.1 *M* Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) (8-羟基喹啉是羧基组织蛋白酶 N 的抑制剂) 及 0.2 毫升溶于 0.25 *M* HCl 中的胰蛋白酶 (100~200 微克)。将试样于 37°C 保温 20 分钟后加入 0.2 毫升 20% 三氯乙酸以停止反应。15 分钟后用 0.5 *N* NaOH (0.65~0.67 毫升) 中和样品, 用 4 *mM* 草酸将体积调到 2 毫升, 用生物学法测定舒缓激肽的含量。结果用每毫克蛋白质所含单位数表示。

激肽原的分离

试 剂

0.01 *M* 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2~7.4) — 0.12 *M* NaCl。

0.01 *M*, 0.1 *M*, 0.5 *M* 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8) — 0.1 *M* NaCl。

羟磷灰石, 按 Tiselius 等 (1956) 的方法合成。

人的新鲜唾液, 用前经 2000 *g* 离心 20 分钟。

1 M 三乙胺碳酸氢钠缓冲液(pH 8.0)。用 CO_2 通入 0.1 M 三乙胺,直至达到 pH 8.0,以制备此缓冲液。在实验之前稀释到一定的浓度。

分离过程

第一步,血浆的制备

取兔颈动脉血放入一个有刻度的聚乙烯容器中(容器中盛有 4% 柠檬酸钠溶液,按每 10 体积血放 1 体积柠檬酸钠溶液),1500g 离心 20 分钟。用带有聚乙烯斜头的注射器吸出血浆,使其与血液的有形成分分开。

第二步,激肽原在 DEAE-Sephadex A-50 上的吸附

将 400 毫升血浆用含有 0.12 M NaCl 的 0.01 M 磷酸钠缓冲液(pH 7.2~7.4)稀释 2 倍后,放入含有 400 毫升 DEAE-Sephadex A-50 的稠悬液的烧杯中(DEAE-Sephadex 先用同一缓冲液加以平衡)。将混合液用磁搅拌器在室温下(18~20°C)搅拌 1 小时,这样的条件下,80~90% 的加入到阴离子交换剂中的血浆蛋白质不被吸附。在布氏漏斗上将混合液抽滤,用含有 0.12 M NaCl 的 0.01 M 磷酸钠缓冲液(pH 7.2~7.4)洗涤阴离子交换剂。

将 DEAE-Sephadex 转移到柱子(3.2×55 厘米)上,用 0.01 M 磷酸钠缓冲液(pH 7.2~7.4)—0.12~0.6 M NaCl 直线浓度梯度洗脱。洗脱液总体积 800 毫升。为了完全从凝胶上洗下蛋白质,再用 200~250 毫升 0.6 M NaCl—0.1 M 磷酸钠缓冲液洗脱,流速每小时 90 毫升,每一组分的体积为 8 毫升。

根据与人唾液激肽释放酶的反应来探测所得组分中激肽原的存在。为此,在 0.05 毫升洗脱液中加入 0.1 毫升人唾液后,将混合液在室温中保温 1 分钟,然后将它放入一个盛有离体大鼠子宫角的盆子中,如果组分中有激肽原存在的话,则大鼠子宫角就会收

缩。将 0.05 毫升缓冲液与 0.1 毫升唾液放入盛有离体大鼠子宫角盆子中以作为对照。

如在图 14 中所见到的，在缓冲液中 NaCl 的浓度为 0.17~0.42 M 时，激肽原就从柱上被洗脱下来(管号 37~70)。激肽原的最大浓度在 32~58 号管中。将 32~58 号管中的洗脱液合并，用 0.65 饱和度硫酸铵使蛋白质沉淀并作进一步的纯化。

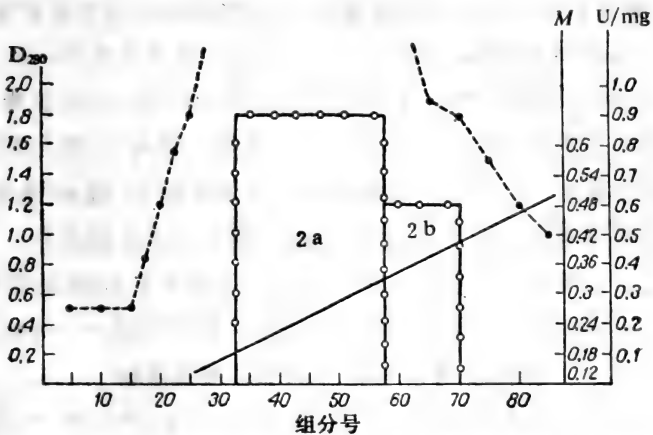


图 14 用 DEAE-Sephadex A-50 柱纯化激肽原。实验条件见正文 (纯化的第二步)

纵座标——蛋白质的含量(280 nm 光密度单位)(虚线); NaCl 的克分子浓度(M)(实线); 激肽原含量(U/mg)(•••••)。横座标——组分(按收集器的试管序号), 每一组分的体积 8 毫升

在组分 2b 中(见图 14) 含有高分子激肽原, 人血浆激肽释放酶从激肽原上切下血管舒缓激肽, 但该酶不能从组分 2a 形成激肽。

Sephadex G-25 凝胶过滤。为了进一步在羟基磷灰石上提纯激肽原, 离心收集组分 2a 的沉淀(1500g), 将沉淀溶于最小体积的含有 NaCl 的 0.01 M 磷酸钠缓冲液中 (pH 6.8)。然后将它过 Sephadex G-25 柱(2.5×25 厘米) 以除去硫酸铵 (柱子预先用同一缓冲液加以平衡)。用不含硫酸铵的蛋白质溶液(奈氏反应阴性)

作分离激肽原之用。

第三步, 羟基磷灰石吸附

用含有 0.1 M NaCl 的 0.01 M 磷酸钠缓冲液 ($\text{pH}6.8$) 平衡羟基磷灰石。实验中采用新制备的贮存期不超过 2 个月的羟基磷灰石。吸附作用在烧杯中进行。

将 Sephadex G-25 柱凝胶过滤后所得的蛋白质溶液放入盛有 50 毫升羟基磷灰石悬液的烧杯中, 用搅拌器将混合液在室温下搅拌 1 小时, 5000 g 离心 20 分钟, 用 40 毫升缓冲液洗涤沉淀 2 次, 用含有 0.1 M NaCl 的 0.1 M 磷酸钠缓冲液 ($\text{pH}6.8$) 洗脱吸附在羟基磷灰石上的激肽原。为此, 在吸附剂中加入 50 毫升缓冲液, 搅拌 1 小时后, 离心, 将羟基磷灰石从溶液中除去, 用 40 毫升缓冲液洗涤羟基磷灰石沉淀 2 次, 将洗脱液与第一次洗脱液合并。

在所得的组分中(表 21 中以 3a 表示)集中了 68% 的激肽原。用硫酸(0.65 饱和度)沉淀出组分中的蛋白质以作进一步纯化之用。

第四步, Sephadex G-200 柱凝胶层析

将上一步所得的蛋白质沉淀(离心, 5000 g , 20 分钟)与上清分开后溶解在最小体积的(约 12 毫升)含有 0.1 M NaCl 的 0.01 M 磷酸钠缓冲液 ($\text{pH}6.8$) 中, 上 Sephadex G-200 柱 (2.5×50 厘米), 柱子预先用上述缓冲液加以平衡。洗脱时缓冲液流速为每小时 20 毫升, 每一组分的体积为 3 毫升。

30~75 号收集管中都含有激肽原(图 15)。最大活力在 45~55 号收集管中。将洗脱液按激肽原含量合并成三个组分: 4a, 4b, 4c。在 0.65 饱和度硫酸铵中沉淀蛋白质, 离心收集沉淀, 将它溶解于最小体积的蒸馏水中, 将此溶液在 Sephadex G-25 柱 (1.5×25 厘米)上脱盐(柱子预先用水平衡)后冰冻干燥。

第五步, 聚丙烯酰胺凝胶制备电泳

从组分 4b 所得的激肽原制品, 尽管杂质的含量不超过 25%,

但按蛋白质组成来说却是不均一的。在圆盘凝胶电泳时(7.5%聚丙烯酰胺凝胶, Tris-甘氨酸缓冲液, pH8.9, Davis, 1964), 除了与 α_1 -球蛋白的迁移率相同的激肽原外, 还见到有位于清蛋白, β_2 -及 α_2 -球蛋白的位置上的蛋白质组分。

作某些生物化学研究时, 特别是对激肽原作化学鉴定时必须采用电泳上均一的并且含有最高活力组分的制剂(20 U/mg)。

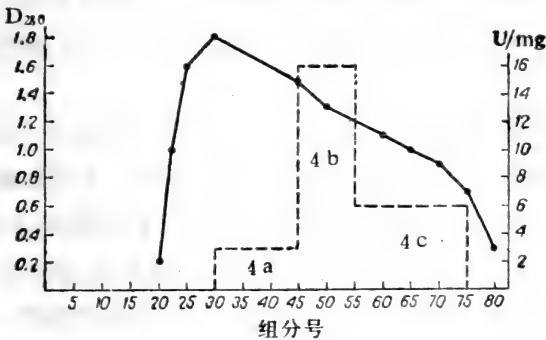


图 15 组分 3a 用 Sephadex G-200 凝胶层析。实验条件见正文 (第四步纯化)

纵座标——蛋白质含量(280 nm 光密度单位)(实线); 激肽原含量(U/mg 蛋白质)(虚线)。横座标——组分号, 每一组分的体积 3 毫升

为了制备高度纯化的激肽原制剂, 采用了用电泳分离样品后从凝胶上洗脱蛋白质的方法。使用上面提到过的 Davis 的标准系统, 或者用 Shapiro 等(1967)的方法在特别选择的系统中分离蛋白质。用后面那一种方法时, 将组分 4b(15U/mg) 所得的激肽原制品 3 毫克溶解在 1.5 毫升 0.1% SDS 中, 在 37°C 放置 12 小时后, 加到 12 根 8.5% 的凝胶柱 (6×100 毫米) 上 (凝胶用 0.1% SDS-0.1 M Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0 配制), 在《Reanal 69 型》电泳仪中进行电泳, 电流每管 5mA, 根据溴酚蓝条带移动的位置决定电泳过程何时终止。0.5% 的溴酚蓝预先加于蛋白质溶液中 (3

微升/0.1 毫升)或加于电极缓冲液中(1 毫升/1 升)。电泳持续约 1.5 小时。

从玻璃管中取出凝胶柱。为了尽快确定蛋白质区带的位置,将凝胶柱浸入 12% 三氯乙酸溶液中 5~10 分钟,至凝胶表面出现白色发乳光环时为止。

将其中一条凝胶柱用 2% 氨基黑 10 B (溶于等体积的 20% 乙酸与丙酮溶液中)显色过夜作为对照,多余的染料用电泳除去,检出与对照凝胶上染上颜色的条带相应的被三氯乙酸所显示的条带。

从凝胶柱上切下被三氯乙酸检出的具有激肽原迁移率的最宽的蛋白质条带,放入带有最小体积的 0.2 M 三乙胺碳酸氢钠缓冲液(pH 8.0, 含 0.1% SDS)的试管中,在 37°C 放置 2~3 小时后,倾出洗脱液,将凝胶冰冻后重新倒入同样的缓冲液。如此重复再操作 3~4 次。将洗脱液合并后冷冻干燥。将干燥的物质溶于少量水中,在生物胶 P-4 柱上进行彻底脱盐(柱子先用水加以平衡)。收集在波长 280nm 有吸收的组分。

表 21 所示是一个分离及纯化激肽原实验的结果。

纯化后的激肽原的性质

应用制剂 4b 对兔激肽原的基本性质作了研究。这个制剂在聚丙烯酰胺凝胶电泳时是不均一的。电泳图谱上,除了在 α_1 -球蛋白区域上有一条基本条带外,在 α_2 -及 β_2 -球蛋白区域有几条浅的条带。

用 Sephadex G-200 凝胶电泳法测定所分离的激肽原的分子量为 54000~56000。等电点在 pH 3.15~3.5 之间 (Т. П. Егорова, Т. С. Пасхина, 1967)。

这种激肽原可作为兔血浆激肽释放酶,人唾液及人尿激肽释

表 21 从兔血浆分离及纯化激肽原

纯化步骤	组 分	蛋白质含 量(克)	单位/毫 克蛋白质	组分的 活力单位	产 率 (%)	纯化程度
1. 血清(400毫升)		22	0.07	1540	100	1
2. DEAE-Sephadex A-50 层析	2a	1.5	0.8	1200	72	11
	2b	0.3	0.5	150	10	
3. 组分 2a 在羧基磷灰石 上的吸附	3a	0.3	3.5	1050	68	50
4. 组分 3a 在 Sephadex G-200 上凝胶层析						
试管号: No. 30~44	4a	0.1	2.0	200	13	30
No. 45~55	4b	0.04	15.0±2	600	39	210
No. 56~70	4c	0.08	5.0	400	25	70
5. 组分 4b 的聚丙烯酰胺 凝胶电泳	5a	0.016	20.0±2	320	21	300

放酶及胰蛋白酶的底物。这种激肽原制剂可以用于研究激肽原酶反应的模型试验。

胰蛋白酶从 1 毫克激肽原制品 4b 可以切下 15 ± 2 微克血管舒缓激肽, 这个量相当于制剂中激肽原含量的 60~80%。胰蛋白酶能从 1 毫克电泳上均一的制品 5a(见表 21)切下 20 ± 2 微克血管舒缓激肽, 这代表分子量为 50000 的纯激肽原。最后的那个制剂已用于测定兔激肽原分子中的 N-及 C-末端氨基酸。

人血中羧肽酶 N(激肽酶 I)的酯酶活力的测定。

马尿酸-L-精氨酸的合成

С. С. Трапезникова, Е. Б. Россинская,
Б. Л. Крайнова, Е. С. Чаман, Т. С. Пасхина

人及哺乳类的血浆羧肽酶 N(Erdös, 1961) 是第一个仔细研究过的激肽酶(激肽酶 I)。这个酶通过切除精氨酸的 C-末端而

使血管舒缓激肽失去活力。

血管舒缓激肽的短时间低血压效应及它短暂的半衰期 (13~17 秒) 在很大程度上是由于血浆中的羧肽酶 N 所决定的 (Т. С. Пасхина, 1966; Erdös, Yang, 1970)。这个酶在血浆中的含量相当恒定。肝硬化时它的活力降低。在怀孕的最后三个月, 它的含量上升 (Erdös et al., 1965; Erdös, Yang, 1970)。新生儿血浆中这个酶的活力比成人的低 2 倍。在许多并发有血纤维蛋白溶解作用过度或血液凝固作用过度以及激肽系统活化作用过度的疾病中, 测定血浆中羧肽酶 N 的水平具有重要的临床意义。

血浆羧肽酶的活力可用生物学方法 (血管舒缓激肽的失活) 也可用化学法加以测定。用化学法测定时, 马尿酸-L-赖氨酸 (С. С. Трапезникова, Т. С. Пасхина, 1968; Erdös et al., 1965), 马尿酸-L-精氨酸 (HAA) (Т. С. Пасхина и др., 1972; Erdös et al., 1967) 或二硝基苯基化三肽 (DNP-Gly-Gly-Arg) (Л. А. Люблинская и др., 1973) 都可以作为底物。应用后面两个底物可以得到更为精确的结果。

测定血清羧肽酶 N 酯酶活力是一个更为简单而又快速的方法; 此酶水解酯键比水解肽键快, HAA 的稀缺及合成上的困难是这个方法的限制因素。

下面叙述根据 HAA 的水解速度测定人血清羧肽酶 N 的酯酶活力的分光光度法示例 (Т. С. Пасхина, и др., 1972)。这个示例是 Erdös 等人 (1967) 方法的改良法。也列举了一个独创的 HAA 合成法 (Б. Л. Крайнова и др., 1970)。

人血清羧肽酶 N 活力的测定

方法原理

这个酶催化下列反应:



这个方法的原理是根据对 HAA 酯键水解时释放出来的马尿酸量的测定。马尿酸在 254 nm 处具有比 HAA (1.06×10^3) 更大的克分子消光系数 (2.17×10^3)，因此波长 254 nm 下样品光密度的增加与血清中所含的酶水解 HAA 的速度成正比。

试 剂

0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)。

1 m M HAA·HCl 溶液，溶于 0.05 M pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中 (底物)。3.70 毫克 HAA·HCl 溶于 10 毫升缓冲液中。

1 m M 马尿酸溶液，溶于同样的缓冲液中。将 17.9 毫克马尿酸溶于 100 毫升 Tris-HCl 缓冲液中，马尿酸在分析前用乙醇重结晶。

分 析 过 程

将缓冲液与底物溶液在水浴中加热至 37℃，然后在分光光度

计的保温比色杯中 (37°C) 加入 1.5 毫升 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH}8.0$) 及 30 微升人血清 (用微量吸量管)。用细玻璃棒加以搅拌, 加入底物 (1.5 毫升 1 m M HAA·HCl 溶液, 溶于同一缓冲液中)。所以, 在酶活力开始测定以前, 血清已被稀释了 100 倍, 而 HAA 的最终浓度则为 0.5 m M 。

加入底物及搅拌后立即开始记录试样在 254 nm 光密度的增加值, 同时以溶解于相同缓冲液中的 0.5 m M HAA·HCl 溶液作为对照。第一次读得的数据是由试样中的蛋白质含量决定的, 把它作为零。测量总共进行 5 分钟, 每隔 30~60 秒钟读数一次。测量结束时, 应用光密度增加-时间曲线中的直线部分算出 1 分钟内 Δ_{254} 的值。因为反应的绝对速度不大 (1 分钟内 ΔD_{254} 为 $0.007\sim 0.009$), 所以必须十分小心地进行分析。一定要设置对照试验, 并严格保持温度 (37°C), 因为这个酶反应的特点是具有较高的温度系数。

图 16 为稀释 100 倍的人血清对 HAA 的水解速度。实验是严格地按上述测定条件完成的。从图 16 可以看出, 只是在开头 3~4 分钟内保持着 HAA 形成与反应时间的正比关系, 这段时间

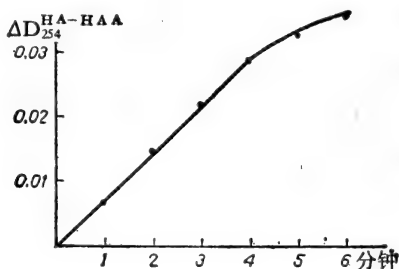


图 16 稀释 100 倍的人血清对马尿酸-L-精氨酸的水解。反应条件见正文

纵座标——波长 254 nm 样品光密度的增加 (对 0.5 m M HAA·HCl);
横座标——HAA 水解的时间 (分钟)

内被分解底物为 10~15%。反应的直线过程很快受到破坏,可能是由于反应产物(精氨酸)的抑制作用引起的。

血清中酶活力的计算

从实验中测得的 1 分钟内 ΔD_{254} 的数值($\Delta_{254}^{1 \text{ 分钟}}$) 计算出酶活力。根据标准曲线从酶活力(图 17)或根据克分子消光系数算出与这些数值相当的在 3 毫升样品中在 1 分钟内由酶所水解的 HAA μM 数。最后,以 1 毫升血清在 1 分钟内所水解的 HAA μM 数或以 1 毫升血清中酶的单位(U) (酶活力的国际单位) 表示实验结果。

为了制作标准曲线,用 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 将原始 HA 及 HAA (1m M) 溶液配制一系列稀释溶液——0.0625, 0.125, 0.25, 0.50m M。以缓冲液作为对照测定 HA, HAA 的光密度, 算出它们的光密度值的差额, 并对相应的克分子浓度的溶液作图。

从图 17 的标准曲线可以看出 HA 与 HAA 光密度之差值 Δ_{254}^{HA-HAA} 为 0.1, 相当于 1 毫升中含有 0.151 μM HA 之量。既然 HA 的增长等于 HAA 的减少, 那么在下列公式中可用此值作为计算的常数:

$$\frac{\Delta D_{254}^{1 \text{ 分钟}} \times 1.51 \times 3 \times 1}{1 \times 0.03}$$

$$= \Delta D_{254}^{1 \text{ 分钟}} \times 151 \mu M \text{ HAA} / 1 \text{ 毫升血清} (1 \text{ 分钟})$$

式中 $\Delta D_{254}^{1 \text{ 分钟}}$ 为实验中求得的在 1 分钟内光密度的增加值; 1.51 为

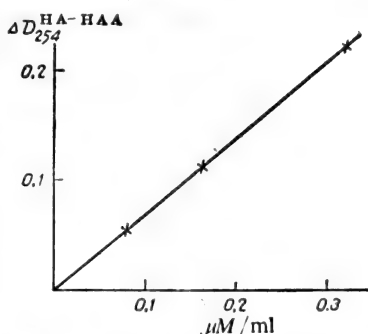


图 17 有 HAA 存在时用分光光度法测定 HA 的标准曲线

纵座标——254 nm 下, HA 与 HAA 光密度之差值; 横座标——1 毫升样品中 HA 的微克分子数

在 $\Delta D_{254}^{\text{HAA}-\text{HAA}} = 1.0$ 时, 1 毫升试样中被水解的 HAA 的 μM 数; 3 为试样的体积; 0.03 为用于分析的血清取样量(ml)。

应用这个方法我们发现: 健康人血清中羧肽酶N的活力为 $1.05 \pm 0.21 \mu M \text{HAA}/\text{分钟}/\text{毫升}$ (或单位/毫升) ($M+m$)。不同人之间羧肽酶N活力的变化幅度为 0.75~1.35 单位/毫升。

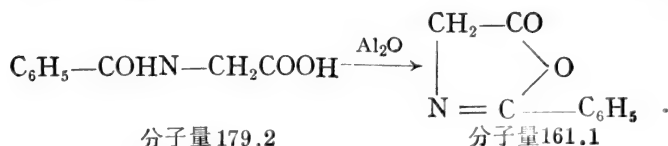
在烧伤休克时发现酶活力下降 30~40% (0.5~0.8 单位/毫升)。在急性毒血症时, 酶活力几乎增加 2 倍, 达到正常值的上限 (1.1~1.35 单位/毫升) (Т. С. Пасхина и др., 1972)。肾炎潜伏期(肾小球器感染)羧肽酶N的活力接近于正常 (0.90 ± 0.165), 而在患肾综合症(有血液凝结过快, 血栓及血纤维蛋白溶解作用过度的症状)时, 酶活力大大提高, 甚至达到 1.57 ± 0.16 单位/毫升。可能, 这一事实与血浆中某些在 C-末端带有 Lys 及 Arg 残基的肽的含量增加有关。

邻马尿酸- α -氧基- δ -胍基-L-戊酸

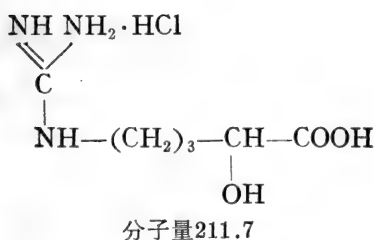
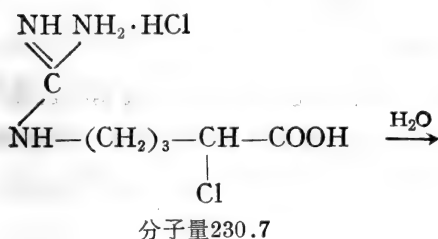
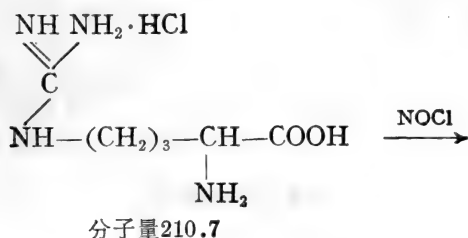
(邻马尿酸-L-精氨酸)的合成

文献中迄今只报导了从马尿酸盐酸盐和精氨酸合成邻马尿酸-L-精氨酸(HAA)的一种方法(Folk, Gladner, 1959), 但是用这种方法时, 经过艰巨的纯化工作后 HAA 的产率只有 6%。下面所建议的从 2-苯基-噁唑酮-5 (2-фенилоксазолон-5) 及精氨酸合成 HAA 的方法 (Б. Л. Крайпова, С. С. Кипоренко, Е. С. Чаман, 1970), 其特点是简单, 易重复, 产率高(52.5%)。HAA 的合成分三步进行。

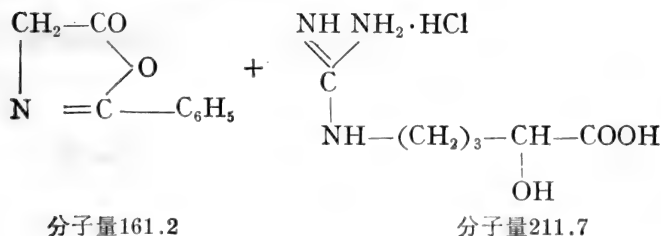
1. 从马尿酸制备 2-苯基-噁唑酮-5



2. 从精氨酸盐酸盐制备 α -氧基- δ -胍基-L-戊酸盐盐酸盐 (L-精氨酸)



3. 制备邻马尿酸-L-精氨酸盐酸盐





合成过程的叙述

2-苯基-噁唑酮-5 的制备

将 10 克马尿酸(用水重结晶, 100°C 干燥)在水浴中与 25 毫升乙酸酐在 80~90°C 加热至完全溶解。将过剩的乙酸酐在真空中蒸馏(水浴温度 40~50°C)至残留物开始结晶。将残留物与叔丁醇或无水乙醇与戊烷的混合液(1:2)一起研碎, 产率 4.8~5 克, 熔点 88~89°C。

L-α-氯-δ-胍基-戊酸盐盐酸盐的制备

将 5 克 L-精氨酸盐酸盐溶解于 7.5 毫升浓盐酸中(比重 1.18), 加入 3.75 毫升 HNO₃(比重 1.48), 在 60°C 水浴中加热, 将反应液在真空中(浴温~80°C)蒸发至干, 加入 10 毫升浓盐酸, 重新蒸发, 将所得结晶在 6N 盐酸(38 毫升)中结晶, 过滤, 在滤纸上用 10 毫升 6N 盐酸洗涤, 在 NaOH 上干燥, 产率 3.3 克(60%), 熔点 149.5~150°C。

实验值%: Cl⁻——30.7; C₆H₃N₃O₂Cl₂。计算值%: Cl⁻——30.8。

L-α-氧基-δ-胍基-戊酸(精氨酸)盐酸盐的制备

将 7 克 L-α-氯-δ-胍基-戊酸盐盐酸盐溶解于 80 毫升水中, 煮

沸 48 小时,将溶液在真空中蒸发。将 5 毫升水加入残留物中后再蒸馏(如此重复二次)以除去极微量的盐酸。

在所得的物质中加入 10 毫升丙酮,放置到出现结晶。产率 5.8 克(92%),熔点 $151\sim 153^{\circ}\text{C}$ 。可以将此物质不经纯化而用作进一步反应,但必须仔细地在 P_2O_5 上干燥。

为了作分析,将产物从水与丙酮混合液中(20:80)结晶出来,熔点 $158\sim 159^{\circ}\text{C}$ 。

实验值%: Cl^- ——16.60; $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}$ 。计算值%: Cl^- ——16.52。

邻马尿酸-L-精氨酸的制备

将 1.9 克精氨酸盐酸盐及 3.2 克 2-苯基-咪唑酮-5 的混合物(2 倍过量)在 30 毫升叔丁醇中煮沸,将反应进行到完全没有精氨酸为止。为此,分批加入 1.6 克咪唑酮,反应混合液加热的总时间约为 4 小时。用层析法*根据精氨酸的消失判断反应的终止,将溶剂在真空中蒸馏除去,将残留物溶于水中,过滤除去马尿酸结晶,将滤液用乙酸乙酯抽提至完全除去残留的马尿酸。与碳一起加热后过滤,在真空中蒸发至干燥,用二次蒸馏过的无水乙醇 10 毫升将它干燥,将 $\text{HAA}\cdot\text{HCl}$ 结晶与乙醚一起磨碎,过滤,干燥(在 P_2O_5 上)。

产率 1.7 克(52.5%)。

将所得产物(HAA)在 Whatman 1 号纸上层析。溶剂系统:丁醇-乙醇-水(4:1:1),用坂口试剂显色层析谱。 $R_f=0.40$ 。

实验值%: C——46.23; H——5.77; N——14.20; Cl^- ——9.09; $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 。

* 将反应混合液在 Whatman 1 号纸层析,溶剂系统:丁醇-乙醇-水(4:1:1),用精氨酸作标准,用坂口试剂显色层析谱。

计算值%: C——46.09; H——5.90; N——14.34;
Cl⁻——9.30。

根据 Rf 值及实验分析数据,用这个方法所得的 HAA 盐酸盐与文献中报导的没有区别(Wolff et al; 1962)。

人血清抗胰蛋白酶活力的测定

В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина

最近几年大家都很活跃地研究蛋白酶的天然抑制剂,其中包括存在于血浆中的抑制剂。对它们感兴趣的原因是在于它们有多样的和重要的功能:蛋白酶的抑制剂在生物体内,可作为这些复杂和相互联系的酶系统的调节剂,象血液凝结系统、纤维蛋白溶解系统、激肽的系统、补体系统以及防止感染的因素。在卵细胞受精作用机制中起着重要作用的也应归结于蛋白酶的抑制剂(Werle et al., 1972)。

人血清内一般抗胰蛋白酶的总活性是决定于在血清中至少存在的四种胰蛋白酶的抑制剂: α_1 -抗胰蛋白酶, α_2 -大分子球蛋白, 胰蛋白酶 α -间-抑制剂和胰蛋白酶热稳定和酸稳定的抑制剂(Heimburger et al., 1971)。

大于 90% 的抗胰蛋白酶活性是在 α_1 -抗胰蛋白酶部分, 因此根据抗胰蛋白酶活性的大小可以判断在血清中 α_1 -抗胰蛋白酶的量。测定人血清中这个抑制剂的量具有诊断上的意义: α_1 -抗胰蛋白酶遗传上的缺陷常常伴随着成年人非专一性的肺的疾病(Lau-rell, Eriksson, 1965)以及小孩的肝硬变(Sharp et al., 1969)。

α_1 -抗胰蛋白酶是属于所谓《急性炎症期的蛋白质》,在血浆内这种蛋白质的含量在急性炎症的过程中,在传染病及大的外科手术时显著增加。在所有这些情况下可观察到抗胰蛋白酶活性的显

著增高，怀孕时抗胰蛋白酶活性几乎提高二倍。因此测定某些生理和病理状态下抗胰蛋白酶活性是有很大大意义的。

方法的原理

下面所叙述的测定人血清中抗胰蛋白酶活性的方法是经我们改良后的分光光度法 (Storico, Schwich, 1964)。此法的根据是测定被稀释 50 倍后人的血清胰蛋白酶的 $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯-酯酶活性的抑制作用; $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯被胰蛋白酶水解的速度可在波长 253 nm 处试样光密度的增加 (ΔD_{253}) 来进行测定，血清抗胰蛋白酶活性的计算是根据对照管(没有加血清)和试样管(加血清)胰蛋白酶水解 $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯速度的差异，并以 1 毫升血清中相对抑制单位数值来表示。以胰蛋白酶在 25°C 时 1 分钟内能抑制水解 $1 \mu M$ $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯的血清量作为一个单位。

试 剂

0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)。

1.5 mM $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐溶液，用 0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)配制。6.2 毫克 $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯盐酸溶解在 12 毫升缓冲液内；在测定当天配制以避免 $N-\alpha$ -苯酰-L-精氨酸乙酯自身的水解。

0.1% 胰蛋白酶溶液，用含有 10 mM $CaCl_2$ 的 1m M HCl 配制；1 毫克胰蛋白酶(结晶制品)溶于 1 毫升上述溶液中；在 4°C 时溶液能保存 7~10 天。测定前将 0.1% 胰蛋白酶溶液用 1m M HCl 稀释 10 倍。

测 定 过 程

在着手分析时，把人血清用生理盐水稀释 50 倍 (0.1 毫升血

清添加 4.9 毫升 0.9% NaCl 溶液)。在分光光度计的比色杯内准备二个样品——试验的和对照的，试验的样品管中含有 1.9 毫升 0.05 M Tris-缓冲液 (pH 8.0)，0.1 毫升按 1:50 稀释后的血清和 0.1 毫升胰蛋白酶溶液 (10 微克)。对照样品管中含有 2 毫升 Tris-缓冲液和 0.1 毫升胰蛋白酶溶液 (10 微克)。二个样品在分光光度计 25°C 恒温比色杯内保温 5 分钟，然后向每管加入 1 毫升 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯溶液；迅速混匀，在波长 253 nm 下以 2 毫升 Tris-缓冲液和 1 毫升 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯溶液作对照管测其光密度的增加 (ΔD_{253})；在 4~5 分钟内每分钟读数一次。

抗胰蛋白酶活性的计算

在波长 253 nm 下光密度的增加与反应时间关系的曲线的直线部分中找到试验样品与对照样品在 1 分钟内光密度的增加 (ΔD_{253})，利用这些数值之间的差异，依据公式可计算抗胰蛋白酶活性。

$$\frac{(V_o - V_i) 2.73}{0.1} \times 50 = \text{抑制单位数/1 毫升血清}$$

式中 V_o 和 V_i ——在对照和试验样品中胰蛋白酶水解 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯的速度，相等于试验样品和对照样品在 1 分钟内光密度相应的增加 ΔD_{253} ；2.73——为了计算该试验条件下样品中 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯被水解的量 (μM) 的计算系数；此数值是根据 1 mM N- α -苯酰-L-精氨酸和 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯溶液光密度的差值是 1.1 和试样体积是 3 毫升 ($\frac{3}{1.1} = 2.73$) 而得；0.1——为了分析所取稀释过的血清量 (实验样品)；50——稀释倍数。

我们建议用于分析的血清以取 1:50 稀释后的血清 0.1 毫升

为宜, 这样选择为的是使抑制数值不超过 50~60%, 如果被测血清抗胰蛋白酶活性很高, 抑制作用超过 50~60%, 那么为了分析只要取此稀释的血清 0.05 毫升就足够了。

用胰蛋白酶水解 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯是一个带有高温度系数的酶促反应, 所以必须严格控制温度在 25°C。如果分光光度计不带恒温装置, 那么可把试管放入恒温水浴内进行反应; 每次测量光密度前把管子内的样品倒入比色杯中。

在应用这个方法时我们发现, 在人的正常血清或血浆内抗胰蛋白酶活性为 30 ± 7 抑制单位数/毫升; 当人被烧伤时(过渡到毒血症阶段时)抗胰蛋白酶活性含量增加 2~4 倍, 所以可以作为诊断的指标(Т. С. Пасхина и др., 1972)。

从兔血清制备高度纯化的热稳定和酸稳定的 胰蛋白酶抑制剂

В. Ф. Нартикова, О. Г. Оглоблина,

Р. И. Якубовская,

Л. В. Платонова, Т. С. Пасхина

在最近出现一系列有关提取(从不同来源)和纯化对热和酸稳定的蛋白质性质的胰蛋白酶抑制剂的工作, 看来, 这些抑制剂在哺乳动物和人中起着特殊的生理作用, 说明这些化合物特性的研究有很大的意义。

胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的高活性抑制剂 (Т. С. Пасхина, В. Ф. Нартикова 1966; В. Ф. Нартикова и Т. С. Пасхина, 1970) 不同于所有其它 α_1 -糖蛋白性质的抑制剂, 因为糖蛋白性质的抑制剂存在于人和哺乳动物的血浆内, 分子量很小, 它的结构中有 5~6 个二硫键; 此特性保证了抑制剂在酸性环境中对热的稳定

性。从兔血中所得的胰蛋白酶的热和酸稳定的抑制剂平均分子量是在 23000 ± 1000 左右, $pI \sim 2.9$; 含糖 22%; $K_i = 1 \times 10^{-10} M$ (对胰蛋白酶来说); 胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂活性占兔血清总的抗胰蛋白酶活性 12~16%。在兔血清中所含的热和酸稳定的抑制剂比在人血清中高 5~10 倍。我们研究所选用的材料证实了这种情况。

下面将叙述提取胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的二种方法: 一种方法是在经典的层析方法基础上再用 2.5% 三氯乙酸溶液来提取抑制剂; 另外一种方法用胰蛋白与 Sepharose 4B 共价结合的生物学上专一的柱层析方法。

第一种提取和纯化胰蛋白酶的热 和酸稳定性抑制剂的方法

此方法是过去我们所论述过的从兔血清提取胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂方法的改良法(В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина, 1969)。

方法的原理

制备高度纯化胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂是基于它的酸性特性($pI \sim 2.9$), 由于此酸性特性保证了它与阴离子交换剂牢固的结合, 以及它能溶解在 2.5% TCA 中, 有可能从大部分非活性蛋白质中将抑制剂分离出来, 利用 0.5 饱和度硫酸铵沉淀的兔的血清蛋白组分作为原始原料, 胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂在 Sephadex G-200 凝胶上作最后的纯化。

试 剂

胰蛋白酶结晶(捷克斯洛伐克«Spofa»)。

N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯(«California Corporation»美国)。
DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-25, Sephadex G-200
(«Pharmacia»瑞典)。

0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)。

0.01M 磷酸缓冲液(pH 6.7~6.8)。

5% 三氯乙酸溶液(TCA)。

胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂活性的测定

在提取和纯化过程中根据胰蛋白酶的 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯-脂酶作用的抑制作用来测定胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的活性(B. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина, 1969)。

测定过程

0.1 毫升胰蛋白酶溶液(10 微克)溶于 2.5 m M HCl 溶液中, 与 1.9 毫升抑制剂(溶于 0.5 M Tris-HCl 缓冲液 pH8 根据纯化的程度含有 2~100 微克胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂)在比色杯中混匀。在 25°C 预温 5 分钟后添加 1 毫升 0.015 M N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯溶液, 对照管以添加 1.9 毫升缓冲液代替抑制剂。以仅含试剂的管子作对照, 在 CФ-4 分光光度计 253 nm 波长下测定试样与对照样品中光密度的增长, 每 1 分钟读数一次。胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的活性是根据实验与对照样品光密度增长的差值(ΔD_{253}), 以抑制单位来表示。一个抑制单位相当于在标准条件下 1 分钟内抑制胰蛋白酶水解 1μ M N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯的抑制剂的量。

在兔的全血清中及含有热不稳定性的胰蛋白酶抑制剂的 0.5 饱和度的硫酸铵组分中, 胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的测定可以用下列方式进行: 取 0.5 毫升用 0.9% NaCl 溶液稀释 20 倍的

血清(或者 0.5 毫升组分 2 的制品溶液, 表 22)与 0.1 毫升 0.5 *M* 醋酸钠缓冲液(pH 4.1)混匀后在 60°C 水浴中加热 20 分钟, 冷却后添加 0.09 毫升 0.5 *N* NaOH 溶液中和试样, 加 0.05 *M* Tris-HCl 缓冲液(pH 8)使试样体积达到 1.9 毫升; 进一步测定抑制剂的活力, 可象上面所论述的方式进行。

制备高度纯化的胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂制品

第一和第二阶段 制备兔血清和用硫酸铵沉淀血清蛋白

把兔颈动脉血收集在聚乙烯杯中, 在 37°C 放 20 分钟 4°C 放 45 分钟。把血在 1500g, 离心 30 分钟以分离血清。所得的血清用水稀释 2 倍, 添加固体硫酸铵达 0.5 饱和度。经过 18 小时后离心分出沉淀, 并将沉淀溶解在少量体积的水中, 对水透析 36 小时后对含有 0.15 *M* NaCl 的 0.01 *M* 磷酸缓冲液(pH 6.8)透析 12 小时。胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂实际上完全富集在所得的组分中(见表 22), 与原来血清相比较它的比活力增加 3~4 倍。

第三阶段 在 DEAE-Sephadex A-50 上吸附

胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂

将含有 0.15 *M* NaCl-0.01 *M* 磷酸缓冲液(pH 6.8)透析过的组分 2, 在烧杯内与 DEAE-Sephadex A-50 一起搅拌, DEAE-Sephadex 先用此同样的缓冲液平衡。在 pH 6.8 时胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂带有许多阳电荷, 它与阴离子交换剂牢固的结合。用含有 0.25 *M* NaCl 的磷酸缓冲液从 DEAE-Sephadex A-50 解吸蛋白质组分。把此组分弃去, 收集 0.5 *M* NaCl-磷酸缓冲液从 DEAE-Sephadex A-50 解吸的组分。此组分的蛋白质用 0.65 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀; 沉淀溶解在水内, 用 Sephadex

G-25 柱(2.5×40 厘米)去盐, Sephadex G-25 先用水平衡。所得溶液中胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的活力是 2 个相对抑制活力单位/毫克(组分 3, 见表 22)。在这组分中不存在胰蛋白酶热不稳定性的抑制剂。

第四阶段 用三氯乙酸提取胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂

向组分 3 的水溶液添加等体积的 5% TCA。在室温下放置 30 分钟后离心分离不溶解的蛋白质, 用 2.5% TCA 溶液洗涤沉淀二次。洗涤液与离心液合并。合并的溶液小心地用 5% NaOH 中和, 用 0.65 饱和度的硫酸铵沉淀胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂。沉淀溶于少量体积的水内, 用 Sephadex G-25 柱过滤去盐; 冷冻干燥蛋白质溶液(组分 4, 见表 22)。用 TCA 提取使胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂的比活力比上一阶段的提高 5 倍, 在这一阶段总活力的丧失, 可能是有部分的胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂与大量的非活性蛋白质一起沉淀之故。

第五阶段 在 Sephadex G-200 柱上凝胶过滤胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂

胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂纯化的最后阶段是通过 Sephadex G-200 的凝胶柱(柱的大小是 1×65 厘米)分离高分子量的化合物。Sephadex 用含有 0.2 M NaCl 的 0.01 M 磷酸缓冲液加以平衡。组分 4 溶解在 1~1.5 毫升缓冲液内后上柱; 缓冲液的流速是 4~5 毫升/小时; 洗脱液分部收集(每组分 0.6 毫升)。测定第二个蛋白峰的每一组分中的抗胰蛋白酶的活性。图 18 是其中一个试验的洗脱曲线。从图 18 上所示的数据可见, 在 Sephadex G-200 柱上凝胶过滤胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂时在洗脱曲线

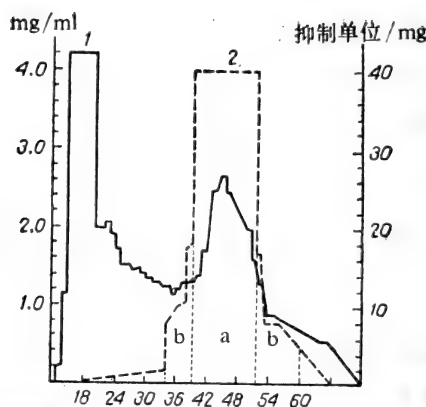


图 18 胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂用 Sephadex G-200 凝胶过滤纯化(组分 4, 见表 22)。实验条件见正文(第五阶段)

纵座标——蛋白质的含量毫克/毫升和胰蛋白酶的热与酸稳定性抑制剂的比活力, 以每毫克蛋白质抑制剂的抑制活力单位来表示; 横座标——洗脱组分即自动部分收集器上收集管号码

1——蛋白质; 2——胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的比活力。a——胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的组分(5a), 它的比活力: 每毫克蛋白质抑制剂的抑制活力单位为 40; b——胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的组分(5b), 它的比活力: 每毫克蛋白质抑制剂的抑制活力单位为 10

的第一部分出现一个大的蛋白峰, 它不具有抗胰蛋白酶的活性; 胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂活性完全与第二蛋白峰相吻合。把具有很大抗胰蛋白酶活性的组分合并, 在 Sephadex G-25 柱上脱盐后冷冻干燥(见表 22 组分 5a)。

表 22 是抑制剂分离过程中的操作程序及纯化各个阶段所得各组分的比活力和根据总的活性计算胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂的产量。

由表 22 可见, 利用这种方法提取胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂, 所得抑制剂的制品的比活力是 35~42 抑制活力单位, 而产量是 27%; 从 1 毫升兔血清能够得到 18~19 毫克高度纯化的胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂制品。

表 22 从兔血清提取和纯化胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂
(第一种提取方法)

纯化阶段	组 分	蛋白质量 (克)	抑制剂的活性		抑制剂产 量按抑 制活力单 位计算	纯化程度
			抑制活力单 位/蛋 白 质 毫克	全部组分 中抑制活 力单位		
第一兔血清 (1100毫升)		66	0.04~0.045	2800	100	1
第二 0.5 饱和度 硫酸铵的组分	2	19	0.14~0.15	2660	91	3~4
第三 DEAE-Se- phadex; 0.25~ 0.5 M NaCl 的 组分	3	0.935	2.0	1870	67	40~50
第四用 2.5% TCA 抽提	4	0.089	10.0	890	32	200~250
第五 Sephadex G-200 凝胶过滤	5a	0.020	35~42	750	27	900~1000
	5b	0.009	10~13	110	4	

提取和纯化胰蛋白酶的热和酸稳定性 抑制剂的第二种方法

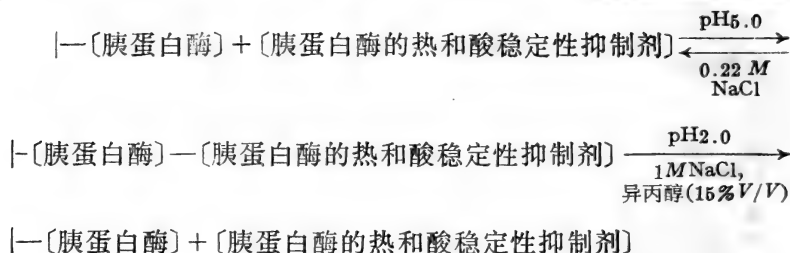
方法的原理

从存在于兔血清中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶热和酸不稳定的抑制剂中分离胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂，其方法是把血清在 pH 4.0 和 55°C 加热 1 小时。收集 0.30~0.55 饱和度硫酸铵沉淀的血清蛋白组分，从这组分中提取胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂，其法是通过胰蛋白酶-Sepharose 4B 专一结合，其条件如下面所述(图解 IV)。

在高离子强度条件下把酶-抑制剂复合物拆开后，在异丙醇存在下，当 pH 从 5 降到 2 时，能得到高度纯化的胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的制品。此制品不含任何其它胰蛋白酶的抑制剂和

任何糖蛋白杂质。

图 解 IV



试 剂

结晶胰蛋白酶(捷克斯洛伐克«Spofa»)。

N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯 («California Corporation» 美国)。

Sepharose 4B («Pharmacia» 瑞典)。

异丙醇, 化学纯。

Sephadex G-25, 中粗 («Pharmacia» 瑞典)。

胰蛋白酶抑制剂 («Bayer» 西德)。

0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)。

缓冲液 A: 含有 0.01 M CaCl_2 的 0.05 M 硼酸缓冲液 (pH 8.9)。

缓冲液 B: 含有 0.22 M NaCl 和 0.01 M CaCl_2 的 0.1 M 醋酸缓冲液 (pH 5.0)。

测定固定化胰蛋白酶的脂酶活性

在 25°C 时将 0.1 毫升胰蛋白酶-Sepharose 4B 的澄清悬浮液和 1.9 毫升 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8) 混和, 然后添加 1 毫升 0.015 M N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯 (溶于 Tris-HCl 缓冲液

中)。经过 3 分钟用 2 号玻璃砂芯漏斗过滤试样, 分离出固定在 Sepharose 上的胰蛋白酶, 在 CФ-4 分光光度计上波长为 253 nm 下测定光密度的增长, 对照管仅含试剂。胰蛋白酶活性以 1 毫克干的 Sepharose 或者以 1 毫升澄清的悬浮液中所含的单位数来表示酶的活力。一个单位相当于在标准条件下在 1 分钟内分解 $1 \mu M$ N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯的酶量。

测定胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的抗胰蛋白酶活性进行步骤如上述(第一种分离方法)。

胰蛋白酶-Sepharose 4B 的制备

溴化氰的合成 在圆底烧瓶中放入 2.5 毫升水和 5.7 毫升溴, 在 2 小时内逐滴加入溶于 63 毫升水中的 9.7 克 KCN; 反应是在不断搅拌下在通风橱内进行的。用冰冷却反应瓶(必须很好抽气!)经此处理后反应混合物应成为淡黄色, 用冰冷却的接受器与反应瓶连接(接受器应同装有 5 M NaOH 溶液齐氏玻璃瓶连接), 在 80~90°C 水浴上 BrCN 进一步升华; BrCN 产量—9.15 克。

Sepharose 的活化 根据 Cuatrecasas 等人的方法(Cuatrecasas et al., 1968)用 BrCN 活化 Sepharose 4B: 50 毫升澄清的 Sepharose 4B 悬浮在 50 毫升 0.05 M 硼酸缓冲液中 (pH 10.0); 向所得的悬浮液添加冰块和 5 到 9.5 克 BrCN; 添加 5 M NaOH 溶液使反应混合液 pH 达到 11, 用 5 M NaOH 溶液电位滴定, 使 pH 维持在此水平上; 经过 10 分钟后用 1 升 0.1 M NaHCO₃ 溶液和 2.5 升缓冲液 A (预先冷却到 4°C) 在玻璃砂芯漏斗上洗涤已活化的 Sepharose。

制备胰蛋白酶-Sepharose 4B 胰蛋白酶的共价结合按 Chauvet, Acher (1972) 的方法进行; 向悬浮在 50 毫升缓冲液 A 的 50 毫升已活化的澄清 Sepharose 4B (总体积 100 毫升) 添加含有 1 克

胰蛋白酶的 16 毫升缓冲液 A。在搅拌下 4°C 反应 18 小时；用含有 0.22 M NaCl 的 2.5 升缓冲液 A 洗涤所得到的胰蛋白酶-Sepharose 4B，然后用 1 升 0.1 M 缓冲液 B 洗涤，直到洗脱液在 280 nm 的吸收消失，胰蛋白酶-Sepharose 在 4°C 缓冲液 B 中保存。

测定固相胰蛋白酶的 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯-酯酶活性的方法如上所述，发现在该条件下所得胰蛋白酶-Sepharose 4B 悬浮液 N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯-酯酶活性在吸附剂澄清悬液中是 10 单位/毫升，相当于 1 毫升澄清胰蛋白酶-Sepharose 4B 中含有活力为 20 单位/毫克的 0.5 毫克胰蛋白酶（在 1 毫升澄清悬浮液中含有干燥至恒重的 50~53 毫克 Sepharose 4B）。

高度纯化的胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂的制备

第一阶段 从兔血清中除去热和酸不稳定的胰蛋白酶抑制剂

将按上述方法制得的 2 升兔血清（提取胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂第一种方法）用水稀释 2 倍，用浓 HCl 酸化到 pH 4.0，在 55°C 加热一小时（表 23，第一阶段）。用干燥无水硫酸铵沉淀血清蛋白质，将硫酸铵饱和度为 0~0.30 所沉淀的蛋白质组分弃去；收集饱和度为 0.30~0.55（见表 23，组分 1B）沉淀部分；把它溶解在水中；用 0.1 mM HCl 溶液平衡过的 Sephadex G-25 柱（5.5 × 150 厘米）去盐，从柱的流出液收集蛋白质组分，蛋白质浓度用紫外分光光度计（CФ-4）在波长 280nm 下比色杯的光径为 1 厘米进行测定（吸收值 1.0 相当于蛋白质含量 1 毫克/毫升）。把所得的蛋白质组分合并，向此溶液添加 4 M 醋酸缓冲液，pH 5.0（最终浓度 0.1 M），再加入固体 NaCl 和 CaCl₂ 至最终浓度相应为 0.22 和

0.01 M。在所得溶液中胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂活性是 0.064 抑制活力单位/毫克(见表 23, 组分 1d)。

第二阶段 用胰蛋白酶-Sephadex 4B 柱层析组分 1 d

用缓冲液 B(pH 5.0) 平衡过的胰蛋白酶-Sephadex 4B 层析柱(2.2×12 厘米)加入组分 1 d 41.5 克(溶在缓冲液 B 中), 其流速是每小时 30~40 毫升。从层析柱流出滤液中(见表 23, 组分 2a) 所得到的是不被胰蛋白酶-Sephadex 4B 吸附的蛋白质。为了除去与吸附剂非专一结合的蛋白质, 用缓冲液 B 洗涤层析柱(见表 23, 组分 2b; 图 19, a 峰)。为了从含有胰蛋白酶复合物中提取胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂(此胰蛋白酶是固着在 Sephadex 4B 上), 可应用溶于 0.01 M HCl, pH 2.0(含有 15% 异丙醇 V/V) 的 1 M NaCl 溶液(见表 23, 组分 2c)。异丙醇由于能降低抑制剂

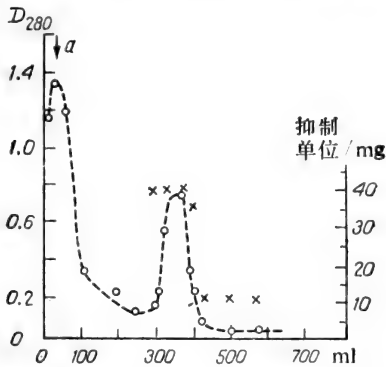


图 19 用生物学上专一的胰蛋白酶-Sephadex 4B 层析柱(2.2×12 厘米)来纯化胰蛋白酶的热和酸稳定抑制剂, 此柱先用缓冲液 B(pH 5.0)平衡 a——用缓冲液 B 洗脱(阶段 2b, 见表 23); b——用含有 1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂ 和 15% (V/V) 异丙醇的 0.01 M HCl 溶液洗脱(阶段 2c, 见表 23)。纵座标——在 280nm 波长下 1 个光密度值的蛋白质含量(虚线)和抗胰蛋白酶比活力-抑制比活力单位/毫克蛋白质(× 字形线); 横座标——洗脱液的体积毫升

表 23 用胰蛋白酶-Sepharose 4B 生物学专一层析从兔血清中
提取和纯化胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂(第二抽提方法)

纯化阶段	组分	蛋白质量 (毫克)	抑制剂的活性		产 量		纯化程度
			抑制活力 单位/毫克	在组分中 抑制活力 单位	按蛋白 质%	按抗胰 蛋白酶 活力%	
第一、a) 兔血清 (2 升) 用蒸馏水稀 释 2 倍	1a	120000	0.025~0.03*	3600	100	100	1
b) 用 0.3~0.55 饱和硫酸铵沉淀	1b	45000	0.075	3350	37.6	93	2.5
c) 在Sephadex G-25上凝胶过 滤, 用 0.1 m M HCl 洗脱	1c	41500	0.074	3060	34.5	85	2.5
d) 组分 1c 酸化 到 pH 5.0	1d	41500	0.064	2700	34.5	75	2.1
第二、组分 1d (1.5 升)在胰蛋白酶- Sephrose 4 B 上层析							
a) 滤液	2a	32300	0.01	323	27.0	9	—
b) 第一洗脱液: 含有 0.22 M NaCl 和 0.01M CaCl ₂ 的 0.1 M 醋酸钠缓冲液 (pH5)	2b	1080	0	0	0.9	0	—
c) 第二洗脱液: 含有 1M NaCl, 0.01M CaCl ₂ 和 15% 异丙醇的 0.01MHCl	2c	52	39~44	1870	0.043	52	1300~1700
d) 组分 2c 在 37°C回旋浓缩器 上浓缩对蒸馏水 透析	2d	50	39~44	1800	0.042	50	1300~1700
第三、高活力的组分 2d 在Sephadex G-75柱上凝胶过 滤; 0.01M 醋酸 铵溶液 (pH7.9) 和冷冻干燥	3	41	42~44	1500	0.03	42	1400~1700

* 在 pH 5.0 和 55°C 加热 1 小时情况下, 兔血清的抗胰蛋白酶活性。

同固相酶的疏水作用能促进胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的洗脱。按上述方法测定所收集组分中抗胰蛋白酶活性。含有胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的组分(见图 19, b 峰)和有同样抗胰蛋白酶比活力的组分合并,在 37°C 回旋蒸发器上浓缩,用蒸馏水透析去盐。

第三阶段 组分 2 d 在 Sephadex G-75 上凝胶过滤

将组分 2 d 在 Sephadex G-75 上进行凝胶过滤(用 0.01M 醋酸铵溶液, pH 7.9 洗脱),以除去了少量高分子物质的杂质。使胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂制品的抗胰蛋白酶比活力在冷冻干燥前后是相同的,为 42~44 抑制活力单位/毫克,此数值相当于胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂制品中抑制剂含量的 $97 \pm 3\%$ (此数值是根据用胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂溶液滴定胰蛋白酶的测定而得到的)(图 20)(Green, 1953)。

因此,用第二种方法实际上在第三步已使抑制剂纯化 1400~1700 倍。将血清胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂加热后其产量为抗胰蛋白酶活性的 42%。此法从 1 升兔血清中能够得到 25 毫克高度纯化的胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂。

用上面所述的二个方法都可制得比活力相似(35~42 和 42~44 抑制活力单位/毫克)的胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂。但是第二种方法是利用生物专一的吸附剂,是比较简便和有效的方法。

以制备量提取胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂提供了从事它的结构研究的可能性。用化学修饰抑制剂功能基团的方法,我们成功的确定了天然胰蛋白酶的抑制剂是属于精氨酸类物质。研究胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂的生理作用、专一性和结构特点是有很大的意义。这种抑制剂特性与 Shulman (1955) 从血清和人尿,

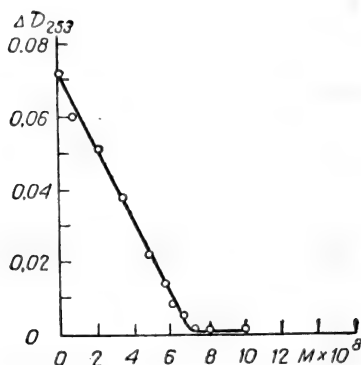


图 20 用胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂滴定胰蛋白酶。在CФ-4分光光度计上进行测定。向比色杯（光径1厘米）倒入3毫升0.05 M Tris-HCl缓冲液（pH8.0）此溶液中含有：胰蛋白酶（根据胰蛋白酶抑制剂 Trasylol*滴定的数据，此制剂含有44%的活性酶）—— $7.3 \times 10^{-3} M$ （换算成100%制剂）；胰蛋白酶热和酸稳定性抑制剂——从0到 $10^{-7} M$ ；N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯—— $5 \times 10^{-3} M$ 纵座标——在波长253 nm下与对照管相比较时光密度增长（ ΔD_{253} ），对照管只含试剂不加酶和抑制剂； ΔD_{253} 是在不同量的抑制剂存在下胰蛋白酶水解N- α -苯酰-L-精氨酸乙酯的相应速度；横座标——添加胰蛋白酶的热和酸稳定性抑制剂的最终浓度，以克分子浓度来表示（ M ） $\times 10^8$

Astrup(1968)从孕妇尿中，Hochstrasser 和其同事(1973)从人血浆和支气管粘膜所提取出来的抑制剂相似。

新的测定蛋白酶活力的微量方法

Л. П. Алексеевко

本文所介绍的测定蛋白酶活力的微量方法是基于测定蛋白质底物被蛋白酶水解时所释放出来的肽中的精氨酸含量。精氨酸含量的测定是用稳定的和改进的坂口反应（Л. П. Алексеевко, В. Н. Орехович, 1971），利用此反应能测定沉淀后和除去没有被分

* Trasylol 是一种蛋白质抑制剂的商名，德国拜耳药厂出品——译者。

解的蛋白质后在三氯乙酸溶液中精氨酸的含量。知道了在蛋白质底物中精氨酸的含量和测定了转移到溶液中的肽中的精氨酸的量后，就可以计算出被蛋白酶水解的蛋白质底物的百分数。此法的主要优点是在于无论 Ансона 或者 Кунитци 方法 (Нортроп 等, 1950) 都不可能计算出被蛋白酶水解的蛋白质百分数。所有重要方法中可测定蛋白质底物水解百分数的只有 Moore 和 Stein (1954) 的茚三酮法，但是此法应用上有其局限性，因为无论对蛋白质-底物或者生成的肽都要求事先进行完全的酸水解。

我们所建议的方法是用游离精氨酸溶液来制作标准曲线。肽和蛋白质是以双缩脲复合物形式进行反应，由此提高了同精氨酸残基进行坂口反应的灵敏性，可做到象游离精氨酸一样的灵敏度。

用经典的底物-血红蛋白作为蛋白质底物，也可用按 Sanger 法氧化的溶菌酶作底物。这个含有 12.7% 精氨酸的低分子蛋白质，无论用胃蛋白酶(断裂约 30 个肽键)或者用胰蛋白酶(释放 18 肽)都能很好的分解它。

试 剂

缓冲液：具有一定 pH 值的磷酸缓冲液，柠檬酸缓冲液，醋酸缓冲液，硼酸缓冲液。

蛋白质底物：1% 血红蛋白或者氧化的溶菌酶溶液(溶于适当的缓冲液内)。

溶菌酶的氧化(Sanger, 1949)：将 1 克溶菌酶溶解在 35 毫升甲酸中，向此甲酸中事先添加 4 毫升 30% H_2O_2 溶液。混合物在室温下放置 15 分钟，然后添加 40 毫升水，减压浓缩到 2~4 毫升，用 200~300 毫升冷的丙酮沉淀。

离心分离出沉淀物，用丙酮洗涤沉淀物除去甲酸后在空气中干燥。

次溴酸钠。1 毫升溴溶于冷的 $1N$ NaOH 溶液中,使用前次溴酸钠用 $0.25N$ NaOH 溶液稀释 8 倍。

2,4-二氯-1-萘酚。

合成: 5 克 1-萘酚溶于 50 毫升冷冰醋酸中,在冷却情况下通入氯气直到气体经过黄色的液体不引起液体发黑(黑云)时为止。

检验 2,4-二氯-1-萘酚: 加几滴反应混合物到试管中,蒸发到干,溶于几滴 $2N$ NaOH 溶液中,溶液不应发青,发青表示由于过度的氯化而产生了三氯酮。如果不发青,那么蒸发除去醋酸到出现结晶,放到第二天以使其结晶。在冰醋酸中重结晶,2,4-二氯-1-萘酚形成无色针形结晶,在空气中变混并分解: 熔点 $107\sim 108^{\circ}\text{C}$ 。

原液: 0.2% 2,4-二氯-1-萘酚溶于无水乙醇中。使用前把 1 份此溶液和 5 份 $0.25N$ NaOH 溶液和 2 份叔丁醇混和。

10% 硫二甘醇($\text{HO}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2$)₂S 的乙醇溶液。

$2.5mM$ CuSO_4 溶液。

$5N$ KOH(或者 NaOH)溶液。

10% 三氯乙酸(TCA)溶液。

精氨酸。

α -N-苯酰-替精氨酸胺(BAA), α -N-苯酰-精氨酸-乙酯(BAEE), α -N-苯酰-精氨酸-甲酯(BAME)和 α -N-苯酰-精氨酸(BA)。

胰蛋白酶(结晶)。

胃蛋白酶。

测定步骤

在着手进行成批的测定被研究组织抽提液或者生物体液蛋白酶活力之前必须注意到:

1. 为了把研究的酶的活力表现出来必须测定酶的活力与

pH 的关系,并选择最适反应介质。

2. 制作酶活力与酶和底物保温时间的关系曲线图。实验时所选用的保温时间必须是在该时间内酶的活力和它的保温时间之间存在线性关系的那一段时间内。

3. 测定被研究的酶的活力与试样中蛋白质浓度之间的关系。应选择这样的酶浓度,即在该浓度内酶的活力与蛋白质浓度成正比。除此之外还应该考虑到在组织抽提液和生物体液中可能存在有蛋白酶的抑制剂。当试样稀释时,它们浓度降低和蛋白酶的活力增高,通过测定《稀释因素》既能选择测定蛋白酶活力的最适条件也可弄清抑制剂的存在。

4. 当测定酶活力时,必须在保持酶促反应恒定的速度即酶促反应的最大速度下进行。要达到此点必须做到酶被底物全部饱和,在各种不同情况下,必须由实验找到这个最大速度,即在蛋白质浓度和保温时间恒定的情况下,测定不同底物浓度时酶制剂的活力。

当找到了所有这些条件后,即可着手测定一系列蛋白酶的活力。

以蛋白质为底物测定蛋白酶的活力

把底物溶于合适的缓冲液中,取 0.5 毫升,添加 0.5 毫升含有酶的试样(组织提取液,生物体液,纯化或者半纯化酶制剂)保温一定时间后(此时间是通过实验确定的),用 3 毫升 10% 三氯乙酸沉淀试样内的蛋白质。离心分离出沉淀,对上清液(TCA-离心液)进一步加以处理。对照试样管以相反的次序添加试剂:即把 0.5 毫升的酶液加到 3 毫升 10% TCA 溶液中去,再加 0.5 毫升底物。有人建议放置试样使底物自溶:即向 0.5 毫升底物添加 0.5 毫升煮沸的酶液与试验管一起保温后用 TCA 沉淀。

用改良坂口反应测定 TCA-离心液内精氨酸的含量

向 0.5 毫升 TCA-离心液添加 0.5 毫升 2.5mM CuSO_4 溶液, 0.5 毫升 5N KOH 溶液, 0.5 毫升 2,4-二氯-1-萘酚溶液。把此混合液摇匀后加入 0.5 毫升次溴酸钠, 立刻产生亮玫瑰红色。用力振荡溶液, 在 20~30 分钟内(最大显色时间)添加 0.2 毫升硫二甘醇溶液以稳定试样。这一步骤是必须的, 为的是预先防止染色产物被过剩的次溴酸盐所破坏。

添加硫二甘醇后, 无论试样管或者对照管都出现黄色, 这是由于过剩的 2,4-二氯-1-萘酚和次溴酸钠之间的反应所产生的副产物引起的。这副产物同样可用硫二甘醇加以稳定。用分光光度计在波长 520nm 比色杯的光径 1 厘米测定试样的光密度。如果对照管的光密度过大, 那么把试样管和对照管都各加 3 毫升 0.25 N NaOH 溶液进行稀释。

福林(Folin)试剂反应测定蛋白酶的活力

向 0.5 毫升 TCA-离心液添加 0.5 毫升 2.5mM CuSO_4 溶液, 4 毫升 0.5N NaOH 溶液和 1.5 毫升稀释 3 倍的福林试剂。经过 30 分钟后, 用分光光度计在波长 760nm 测定其光密度。

用合成的底物测定胰蛋白酶相类似的蛋白酶的活力

在酶的浓度饱和情况下, 向 0.1 毫升 1mM α -N-苯酰替精氨酸胺或者 α -N-苯酰-精氨酸-乙酯添加 0.1 毫升溶于最适 pH 缓冲液的酶制剂。保温一定时间后, 将未用 TCA 沉淀的试样 40~50 微升点到层析谱上。使反应混合物酸化, 或者使反应混合物立即冰冻, 或者在沸水浴上加热 5 分钟, 以使酶促反应预先停止。

根据在实验中所应用的底物采用表 24 所列的任何一种溶剂

表 24 α -N-苯酰-精氨酸, α -N-苯酰-精氨酸酰胺和 α -N-苯酰-精氨酸-甲酯或者 α -N-苯酰-精氨酸-乙酯纸上层析的结果

溶 剂 系 统	组分比例	Rf 值			
		BAA	BAME	BAEE	BA
2-丁醇-85%甲酸	3:1	0.70	0.90	—	0.86
2-丁醇-异丙醇-水	2:2:1	0.75	0.86	—	0.79
2-丁醇-丙醇-水	2:2:1	0.66	0.82	—	0.71
2-丁醇-异丙醇-85%甲酸	2:2:1	0.73	0.88	—	0.83
2-丁醇-丙醇-85%甲酸	2:2:1	0.67	0.80	—	0.75
2-丁醇-丙醇-85%甲酸	1:3:1	0.70	0.88	0.90	0.81
2-丁醇-丙醇-85%甲酸	1:5:1	0.58	0.72	0.74	0.90
2-丁醇-丙醇-85%甲酸-乙醇	1:3:1:1	0.69	0.82	0.88	0.79
2-丁醇-丙醇-85%甲酸-乙醇-氯乙醇	1:3:1:1:1	0.67	0.79	0.81	0.70
2-丁醇-丙醇-乙醇-氯乙醇(双重前沿)	1:3:1:1	0.48	0.62	0.66	0.48
丙醇-85%甲酸	4:1	0.62	—	0.90	0.79
丙醇-乙醇	3:1	0.55	—	0.77	0.53
2-丁醇-丙醇-乙酸	1:3:1	0.23	—	0.60	0.23
正丁醇-冰醋酸-水	4:1:5	0.52	—	0.89	0.76
苕醇-85%甲酸-水	50:5:1	0.40	0.65	—	0.53
2-丁醇-85%甲酸-苕醇	20:10:15	0.55	0.79	—	0.67

系统进行纸上层析(应用 Whatman 1 号纸)。在这种情况下层析也有可能定性和定量地估计出可能发生的底物的自发分解。

层析谱在气流中干燥直到完全把溶剂蒸发除去,用 0.05% 1-萘酚酒精溶液处理。层析谱在紫外光灯下进行观察,精氨酸的 α -N-苯酰衍生物在由 1-萘酚所产生的荧光背景上出现黑色的斑点。剪下层析谱的相应部位,用 3 毫升 0.25N NaOH 抽提,每管添加 0.5 毫升次溴酸钠工作溶液。出现亮玫瑰红色,经过 20~30 分钟,

加入 0.2 毫升 10% 硫二甘醇(溶于 0.25N NaOH 溶液内) 以稳定此颜色。向试样添加 3 毫升 0.25 NaOH 溶液, 在 520 nm 波长下测其光密度。对照管对水进行测定, 其光密度值不超过 0.030。

标准曲线

用氧化溶菌酶的胃蛋白酶水解产物制作标准曲线

30 克氧化溶菌酶溶于 50 毫升酸化的水中 (40 毫升 H_2O + 10 毫升 0.3N HCl 溶液), 向此溶液添加 0.5 毫克胃蛋白酶, 混合物在室温下放置过夜。经此保温制剂不能用 TCA 沉淀。这个制剂与精氨酸和酪氨酸一起利用来作为制作标准曲线的标准物。制备好稀释成含有 60~600 毫克/毫升的起始溶菌酶, 根据实验样品在试样中加入一定量的 TCA。同样制备好游离精氨酸和酪氨酸溶液, 其浓度分别为 0.04 到 $0.25\mu M$ /毫升。从每一试样中取 0.5 毫升(三组平行试样)用福林法来测定精氨酸和酪氨酸的含量。

图 21 所示标准曲线是用溶菌酶的胃蛋白酶水解物和精氨酸及酪氨酸溶液而制作的。在波长 520 或 760 nm 所测得的试样光密度值, 对精氨酸或酪氨酸或溶菌酶的胃蛋白酶水解物中这二种氨基酸的残基的浓度绘制座标图。曲线 I 是福林试剂同溶菌酶的胃蛋白酶的水解物相互作用情况下而获得的, 它显著的高于曲线 II。曲线 II 是福林试剂同等当量浓度酪氨酸溶液反应而制得的。

曲线 III 是用游离精氨酸, 或者用溶菌酶的胃蛋白酶水解物肽中所含的精氨酸残基的坂口反应而获得的。所有的点都很准确地落在一条直线上。这证明了用 TCA 沉淀的水解物中所有精氨酸都能起坂口反应。福林试剂同酪氨酸的相互作用是不专一的。除了酪氨酸外, 在肽链中的色氨酸, 半胱氨酸都可与福林试剂起反应, 可能某些其它氨基酸残基也会同福林试剂起反应。由铜与四肽和

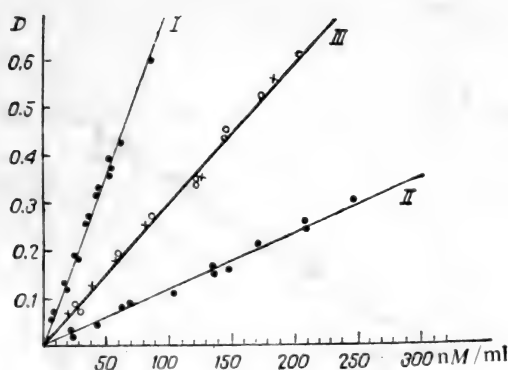


图 21 标准曲线。III是根据用精氨酸溶液(以×字表示)和用溶菌酶的肽水解物(以小圆圈表示)的坂口反应(520nm)的微量法而得到的；I和II是用福林反应(760nm)；II用酪氨酸溶液；I用溶菌酶的肽水解物
纵座标——试样的光密度；横座标——水解液中氨基酸或氨基酸残基的量(nM/毫升)

多肽所形成的双缩脲复合物容易进行这样的相互作用，因此常用的按福林的《酪氨酸当量》所表示的蛋白酶活力，是不正确的。

用 BAME, BAA, BAEE 和 BA 溶液所制作的标准曲线

把 $0.04 \sim 0.3 \mu M$ 胰蛋白酶合成底物点到层析纸上，在正丁醇-HAC-水(4:1:5)或者 α -丁醇-丙醇-85%甲酸(1:5:1)的溶剂系统内进行层析。再用上述的坂口反应进一步测定被分离开的各组成成分的含量。

用合成底物的坂口反应所制作的标准曲线如图 22 所示，在 $50 \sim 300 nM$ 浓度范围内物质的量和光密度之间成正比关系。与 BAA, BA 和 BAEE 相应的所有点都在一条直线上。

在一系列的实验中测定了各种物质对坂口反应的影响，已发现通常用来制备缓冲液的试剂——磷酸盐，柠檬酸盐，四硼酸钠(硼酸钠)，巴比妥钠及吡啶都不抑制坂口反应，所以可用于测定蛋

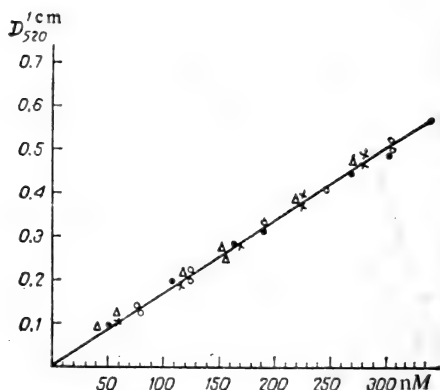


图 22 根据对胰蛋白酶的合成底物和精氨酸溶液的坂口反应，用微量层析法所制作的标准曲线

×字——BAEE；小圆圈——BAA；三角——BA；点——精氨酸
纵座标——在波长 520nm 下光密度值；横座标——点到层析谱上物质的 nM 数

白酶的活性。但是 Tris-缓冲液完全抑制坂口反应，因此不能应用此缓冲液。

测样品的蛋白酶活力之前，还必须从试样中完全除去硫酸铵，尿素，胍，乙二醛，硫代硫酸盐，硫醇盐，酚，糖，如果这些化合物在实验条件下存在于抽提液中的话。三氯乙酸不抑制坂口反应。根据我们数据有游离氨基酸存在时也不抑制坂口反应。

表 25 所示数据是用前述《精氨酸》微量法而得到的，按胃蛋白酶和胰蛋白酶对三种蛋白质底物（氧化溶菌酶，血红蛋白和人血清清蛋白）的活力资料列于此表。后二种蛋白在试验之前经 95°C 30 分钟热变性，在 pH2 时用胃蛋白酶分解蛋白质，而胰蛋白酶的分解蛋白质则是在 pH8.5 时进行。

必须预先声明，蛋白质的分解是一个复杂的过程，这个过程可以用各种类型的反应来加以描述。各种肽键分解的速度是不同的，分解的速度是由氨基酸残基的侧链的性质，蛋白质分子的二级和三级结构以及生成肽片段的大小 (Mihalyi, Codfrey, 1963) 所决

定的。因此在蛋白酶作用下所测定的蛋白质水解速度仅仅是一些相对的数值。

表 25 在三种不同蛋白质底物中借助于«精氨酸»微量法
测得的胃蛋白酶和胰蛋白酶的活力

被分解的蛋白质	胃 蛋 白 酶			胰 蛋 白 酶		
	溶 菌 酶 (分子量 14300, 已 氧化的)	血红蛋白 (分子量 65000)	人血清白 蛋白 (分子量 70000, 已 变性的)	溶 菌 酶 (分子量 14300, 已 氧化的)	血红蛋白 (分子量 65000, 已 变性的)	人血清白 蛋白 (分子量 70000, 已 变性的)
酶——底物比例	1:900	1:500	1:476	1:1700	1:100	1:70
底物分解的%	22 (5 分钟)	22 (7 分钟)	5 (10分钟)	12 (10分钟)	7 (10分钟)	13 (10分钟)
底物水解速度:						
a. 毫克蛋白质/毫克酶/ 分钟	33	31	5	11.5	1.75	1.56
b. M 底物/毫克酶/分钟	2.3	0.5	0.07	0.9	0.03	0.03
c. M 底物/ M 酶/分钟	76.6	16.6	2.3	22.5	0.75	0.5

亲和层析(生物学上专一的层析)

O. B. Казакова

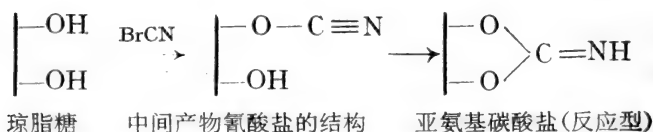
纯化和分离蛋白质的经典实验法是基于蛋白质大分子物理-化学特性的某些差异。但这个方法与经典的方法不同,它是根据生物学上专一的,可逆的相互作用的亲和层析法来纯化酶和其它生物活性物质。在最近几年制成和应用选择性的吸附剂方面,在生物化学不同领域内得到非常广泛的发展,例如:在酶学和免疫学,核酸化学和激素等方面(Cuatrecasas, Anfinsen, 1971a, b)。

亲和层析一般用来纯化由二种或者多种可相互作用的物质组成的复合物系统中的一种成分。基本原理是在于将一种组分固定

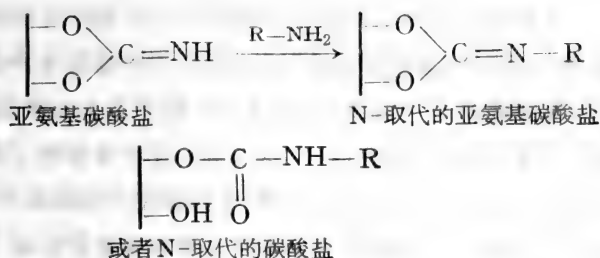
到不溶性多孔疏松基质上(固定化)。连接的组分(配体)可以用来在有利条件下专一地吸附另一的组分,所谓有利条件是指有利于它们的相互作用和形成复合物。被吸附物质的洗脱可采用任一种能使复合物发生解离作用的手段。为了纯化酶经常利用带有载体的竞争性抑制剂。作为配体也可用辅助因子,底物或者底物的片段。在免疫学上亲和层析广泛的用于在结合有抗体的抗原上提纯抗体和在结合抗原的抗体上分离抗原。此法成功地用于分离与维生素和激素有结合的受体蛋白质。亲和层析同样用来浓缩稀的蛋白质溶液,从活性制剂中除去变性的或者修饰了的酶,为了把酶和无活性的前体分开,该法与已知的蛋白质制备的化学方法相比较,它的最大的优越性在于亲和层析通常是快速的一步处理过程,并且被提取的生物聚合物受到最小的变性,因为在提纯时间内,它们的活性中心依靠连接的配体而得到稳定。

为了得到专一的吸附剂常采用多聚糖性质的载体:琼脂,琼脂糖,各种葡聚糖,以及聚丙烯酰胺凝胶和多孔的玻璃表面。最经常应用的是琼脂糖,这是由于它有多孔的结构,保证能使液体很好的流动,大分子能通过,以及由于琼脂糖几乎不存在非专一的吸附。琼脂糖的化学基团,可用溴化氢活化,这些化学基团在温和条件下能够连接各种含有氨基的配体(图解V)。活化了的琼脂糖对溶液中pH,温度,离子强度的变化是稳定的,同时对变性剂——尿素和氯胍也是稳定的。

图解V 琼脂糖的活化作用



含有氨基的配体固定在活化琼脂糖上:



制备活化的琼脂糖

将琼脂糖倾析后所得的沉淀悬浮在等体积水内，向悬浮液添加BrCN，其量是250毫克 BrCN 对 1 毫升琼脂糖沉淀，然后用 2 M NaOH 溶液调 pH 到 11.0。反应 8~12 分钟，在反应时间内逐滴加入 NaOH 溶液，使混合物保持在 pH11。加入小块的冰块到混合物中以防止发热，反应终了时加冰使混合物冷却到 5°C，在布氏漏斗中用 30 倍体积的缓冲液（即是以后进行配体连接用的缓冲液）进行洗涤。活化以后立即添加配体溶液。连接反应是在 4°C 用磁搅拌器不断搅拌下进行 16~20 小时。搅拌速度应该很慢，为的是不使凝胶颗粒破坏。活化琼脂糖的容量因不同的配体而异。与蛋白质结合时能使 95% 的蛋白质成为不溶性衍生物形式。与低分子化合物结合时，所取配体的量应比所欲获得的结合形式的量大 10 倍。在配体连接反应中混合物的 pH 范围可自 8.0 到 11.0 之间。pH 越是碱性，反应越完全和越易进行。在实验条件下活化的琼脂糖是不稳定的，因此它的冲洗和添加配体的过程不应该超过 90~120 分钟。目前《Pharmacia》公司所发售的活化琼脂糖商品制剂具有很高的稳定性。

专一吸附剂的容量的检验是按对配体具有专一亲和性的蛋白质的吸附能力进行的。

将专一吸附剂通常装到一个不大的层析柱中(1~2×8~10厘

米),将柱子用最适合于显示待层析的蛋白质的生物活性的缓冲液平衡后,使蛋白质溶液通过层析柱,蛋白质溶于同样的缓冲液中以保证与配体很好的结合。用能引起蛋白质-配体复合物解离的条件进行洗脱。专一结合的蛋白质往往可用改变缓冲液的 pH 和离子强度办法而洗脱下来;当蛋白质和配体具有较强的相互作用时,必须添加尿素和氯胍。正确的选择洗脱溶液应该使蛋白质与配体的亲和力显著降低,而又不引起蛋白质分子的变性。有时应用竞争性抑制剂溶液进行洗脱,此抑制剂的竞争能力比应用的合成吸附剂强,最后也还有能专一地断裂模板和配体之间的键的方法以及得到配体-蛋白质复合物的方法。

例 1,在胰蛋白酶的不溶性衍生物上通过吸附作用提取卵类粘蛋白(Beeley, McCarins, 1972)。

胰蛋白酶与 Sephadex G-200 共价结合,用来提取胰蛋白酶抑制剂,糖蛋白,和从鸡蛋白和母鸡输卵管中提取卵类粘蛋白。Sephadex G-200-胰蛋白酶制备的方法是将 10 克被溴化氰活化的葡聚糖(800 毫升悬浮液)与 1.5 克结晶的胰蛋白酶反应而得。取鸡蛋白溶液或者母鸡输卵管提取物作为提取卵类粘蛋白的原料。蛋白质溶液在 600g 离心 10 分钟,调 pH 到 7.0,然后向蛋白质溶液添加等体积的浓 Sephadex G-200-胰蛋白酶悬浮液,不被吸附的蛋白质用 5 倍体积的 0.1 M Na_2HPO_4 溶液(pH 7.0)离心洗涤(三次),0.5M NaCl 溶液洗涤(三次),蒸馏水洗涤(三次)。用 2 倍体积 0.1N HCl 溶液(pH 1.5)在离心作用下,从 Sephadex G-200-胰蛋白酶中洗脱卵类粘蛋白。重复上述过程二次。将酸性溶液合并,添加 NaOH 溶液,使 pH 达到 4.0,对水透析 2 昼夜后冷冻干燥,卵类粘蛋白产量是每 1 毫升 G-200-胰蛋白酶悬浮液 1 毫克。

例 2,用卵类粘蛋白抑制剂-琼脂糖柱提取细菌碱性蛋白酶

(Feinstein, Gertler, 1973)。

用装有胰蛋白酶的卵类粘蛋白抑制剂与琼脂糖 4 B 共价结合的柱,只经一步操作就可从 *Aspergillus oryzae* 提取出与碱性胰蛋白酶类似的胰蛋白酶。45 克 *A. oryzae* 的粗制剂溶解在 900 毫升 0.1 M 三乙醇-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,在 9000g 下离心 15 分钟。上清液通过装有卵类粘蛋白抑制剂-琼脂糖凝胶的柱(3×8厘米),这柱事先用三乙醇-HCl 缓冲液平衡。样品上柱后用 700 毫升同一缓冲液洗涤柱,此后用 0.2 M 醋酸溶液洗脱下被吸附的蛋白酶。流速是每小时 50 毫升,蛋白酶活力的测定是根据分解苯酰-精氨酸乙酯的能力。将含有酶的试样,透析后冷冻干燥,得到 30 毫克均一的酶制剂,它的比活力比原来提高了 300 倍,纯化的制品含有原制剂活力的 55%。

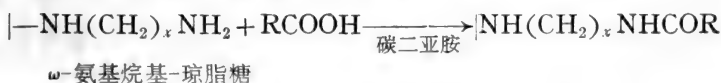
衍生的琼脂糖

为了制作用途更加广泛,更能与不带氨基的配体相结合的琼脂糖支持物,已制订了一系列制备不同衍生的琼脂糖的方法。

ω -氨基烷基-琼脂糖

ω -氨基烷基-琼脂糖得到很大的推广,它是将带有不同长度链的脂肪族二元胺连接到被溴化氰活化了的琼脂糖的产物,所得到的衍生物含有氨基,借助于碳二亚胺可以使配体的自由羟基连接到氨基上(图解 VI)。

图解 VI 配体的羧基与 ω -氨基烷基-琼脂糖的连接



此外,如果配体是低分子的化合物,那么它直接与基质的连接将不

能保证同蛋白质相互作用所需的条件。在这种情况下载体的容量非常之小，以致使大分子蛋白质难以进入配体分子。配体与基质通过烃链的带有柔性的《腿》相连接，这使蛋白质易于和配体相互作用并大大提高了载体的容量。

例 3，用胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)与氨基己基-琼脂糖-4B 共价连接的柱提取组织蛋白酶 D (O. B. Казакова, B. H. Оре-хович, 1975; Corvol et al., 1973)。

为了制备氨基己基-琼脂糖，把 10 毫升活化琼脂糖 4B 的沉淀用 1 mM HCl 溶液洗涤，向此凝胶添加等体积的 2M 己二胺溶液(应先用 6 M HCl 溶液反滴定到 pH 10.1)。反应在室温和用磁力搅拌器很慢的搅拌下进行 3 小时。氨基己基-琼脂糖用大量的水在玻璃漏斗内洗涤，进一步利用胃蛋白酶抑制剂——肽性质的抗菌素，它的结构如下：异戊酰-L-缬氨酸-L-缬氨酸-4-氨基-3-羟基-6-甲基-庚醇-L-丙氨酸-4-氨基-3-羟基-6-甲基庚醇-Na，它是胃蛋白酶和组织蛋白酶类 D 的竞争性抑制剂。

20 毫克胃蛋白酶抑制剂溶解在 2 毫升甲酰-二甲胺中，添加 2N 羟丁二酰亚胺；将 2N 二环己基碳二亚胺溶解在 0.5 毫升甲酰-二甲胺中；溶液冷却到 4°C，倒出后在冷室放置 1 小时。在室温下轻微搅拌下继续反应 3 小时。向反应混合物添加氨基己基-琼脂糖的沉淀，加入 2 毫升甲酰-二甲胺，使成为稀的悬浮液，18°C 用磁力搅拌器搅拌下放置过夜。然后从反应混合物中吸出所有液体，而沉淀用少量体积的甲酰-二甲胺洗涤二次，再用二氧己环和甲酰-二甲胺等体积混合物洗涤二次，最后用大量的水洗涤二次。没有被结合的胃蛋白酶抑制剂可根据它抑制结晶胃蛋白酶分解蛋白质活性的能力来进行测定。在这样的实验条件下与载体结合的胃蛋白酶抑制剂为 15 毫克。

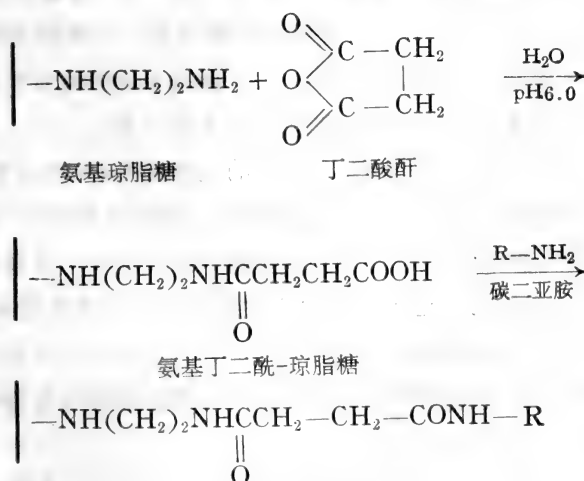
将载体装柱(8×80 毫米)，用水和 0.1M 柠檬酸盐缓冲液(pH

3.9) 洗涤。大鼠肝脏的丙酮抽提物组分蛋白质 250 毫克溶于 0.05M 柠檬酸缓冲液(pH3.9)上柱。用此缓冲液洗涤柱子, 然后用 0.5M NaCl 溶液(酸化到 pH3.5)洗涤, 为了除去非专一吸附蛋白质和组织蛋白酶 D, 用溶于 0.1M NaHCO₃ 中的 0.5M NaCl 碱性盐溶液洗脱。所得的 3 毫克的酶制剂, 其比活力比丙酮抽提组分提高了 60 倍, 其活力约占总活力的 70%。

氨基丁二酰-琼脂糖

为了使含有一级氨基的低分子配体与载体相连, 通常应用氨基丁二酰-琼脂糖。在这种情况下, 借助于碳二亚胺的自由羧基进行配体的结合(图解 VII)

图解 VII 氨基丁二酰-琼脂糖的制备和配体的连接



向倾析后的氨基-琼脂糖沉淀添加丁二酸酐, 其量是按 1 mM 对 1 毫升沉淀之比例。反应是在 4°C 进行; 逐滴加入 20% NaOH 溶液, 使混合物的 pH 保持在 6.0。混合物在 4°C 放置 5 小时, 根

据氨基同三硝基苯磺酸的颜色反应，测定反应的完全程度。含有一级氨基的配体在 pH5 时并在有碳二亚胺存在的情况下发生连接。

其它琼脂糖衍生物

为了分离含有巯基的蛋白质，应采用琼脂糖的有机汞衍生物。可用以下的方法进行，就是把对-氯汞苯(甲)酸盐连接到氨基乙基-琼脂糖凝胶上。向 35 毫升氨基乙基-琼脂糖凝胶的沉淀物添加 60 毫升 40% 甲酰-二甲胺溶液，向此悬浮液中加入 2mM 对-氯汞苯(甲)酸钠，将混合物 pH 调到 4.8，添加 5mM 1-乙基-3,3-二甲基氨基丙基-碳二亚胺。在 1 小时内混合物用 0.1M NaOH 溶液滴定，使混合物的 pH 保持在 4.8，然后混合物在室温下放置 18 小时。所生成的衍生物用 4 升 0.1M NaHCO_3 溶液洗涤 8 小时。所得到的吸附剂，它每 1 毫升经倾析后的沉淀能够连接 40~50 毫克血红蛋白。通常利用 50mM 二巯基苏糖醇或者半胱氨酸的溶液将含有巯基的蛋白质从吸附剂上洗脱下来。

如果必须将含有酚基或者咪唑基的配体连接到琼脂糖载体上，可利用溴乙酰-琼脂糖，它是用溶解在二氧己环中的 O-溴乙酰羟基丁二酰亚胺溶液，在有二环己基碳二亚胺存在下处理氨基乙基-琼脂糖而制得的。这个琼脂糖衍生物易与蛋白质连接也易与一级脂肪族和芳香族的胺起反应。

含有脂肪族羟基的配体借助于碳二亚胺能够同含有自由羧基的琼脂糖的衍生物结合。

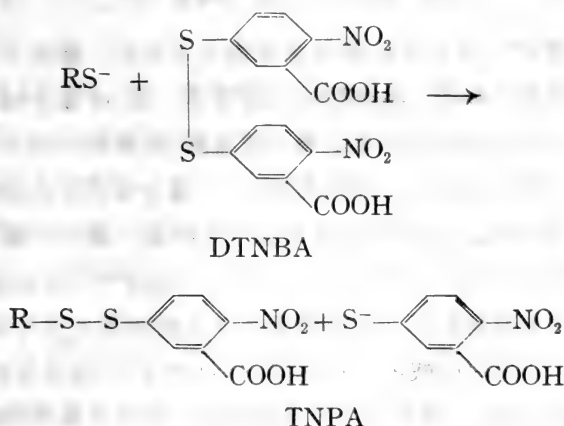
亲和层析的方法继续在蓬勃地发展，它应用的可能性远远不至此处所介绍的这些，生物专一层析的原理已经开始利用来分离下列这些复杂的物质，例如：多聚核糖体复合物，功能性膜的结构和多酶复合物。

用5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸比色法测定 蛋白质的—SH 基和—S—S—键

И. В. Вережкина, А. И. Точилкин,
Н. А. Попова

测定蛋白质中巯基 方法的原理

5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸(DTNBA) (Ellman, 1959)
与蛋白质中的自由 SH-基相互作用以下列方式进行反应:



这个反应过程在 pH 8.0 下进行, 释放出硫代硝基苯阴离子 (TNPA), 所形成的 TNPA 的量与 DTNBA 起反应的蛋白质自由 SH-基的量成正比。在 412nm 波长下 TNPA 的克分子消光系数是 11400 (Robyt et al., 1971)。

试 剂

Ellman 试剂 (39.6 毫克 DTNBA 溶于 10 毫升 0.01 M 磷酸

缓冲液内, pH 7.0)。

0.2 M 磷酸钾钠缓冲液(pH 8.0)。

5, 5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸的合成

原 理

由间硝基苯甲醛制得的间氯苯甲醛, 经过硝化作用转变成 2-硝基-5-氯苯甲醛, 后者可用高锰酸钾水溶液氧化成 2-硝基-5-氯苯甲酸。2-硝基-5-氯苯甲酸与亚硫酸钠相互作用后再用碘氧化形成 2-硝基-5-巯基苯酸而得 5, 5'-二硫代二(2-硝基苯(甲)) 酸。

第一阶段 制备间氯苯甲醛

反应是在 1 升容量的四颈圆底烧瓶中进行, 烧瓶上装有机机械搅拌器, 回流冷凝管, 滴液漏斗和温度计。将 50 毫克间硝基苯甲醛放到圆底烧瓶中, 添加 252 毫升浓盐酸, 在搅拌下加入 225 克氯化亚锡 ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (分几次加入)。因为反应是在加热情况下进行的, 所以反应混合物应在冰盐浴中冷却。氯化亚锡全部加完后, 得到稠密的橙黄色物质, 在 0° 到 -2°C 温度下 (用冰盐水冷却) 用 50 毫升水把它稀释, 在缓慢搅拌下由滴液漏斗加入溶于 90 毫升水中的 23 克亚硝酸钠。在搅拌下小心的将所得混合物 (由于氯气溢出而起泡沫, 倒入加热至沸腾的在一价铜的氯化物的盐酸溶液*中 (盛在 1.5~2 升的烧杯内)。所得的反应混合物呈黑褐色, 用水蒸气蒸馏, 收集 1~1.5 升蒸馏液。将蒸馏液倒入分液漏斗中, 将下层 (微黄色油状) 分离出来, 上层用乙醚抽提 2 次, 每次 100 毫

* 104 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 和 89 克氯化钠溶于加热到 $70\sim 80^\circ\text{C}$ 的 350 毫升水中。向热的溶液倒入含有 23 克焦亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 和 14 克氢氧化钠 (溶于 150 毫升水内) 的水溶液, 用倾析法将沉淀出来的一价铜的氯化物分离出来, 用水洗涤 (同样用倾析法) 后溶于 180 毫升浓硫酸和 50 毫升水的混合液中。

升。乙醚的抽提液与分离出的油状物合并,添加 10~15 克无水氯化钙使其干燥。在水浴上(用带有直形冷凝管的烧瓶或者用回旋蒸发器)蒸去抽提物中的乙醚,而沉淀在水泵减压下蒸馏。间氯苯甲醛的产量是 19.5 克(理论值的 45%),在剩余压力 26 毫米汞柱下熔点 107~109℃。

第二阶段 制备 2-硝基-5-氯苯甲醛

硝基化在 300 毫升容量的四颈圆底烧瓶中进行,烧瓶内装有搅拌器,温度计,空气回流冷凝管和滴液漏斗。

放 142 毫升浓 HCl 于圆底烧瓶内,在冰盐浴中冷却到 -5℃,在搅拌下加入(通过装料漏斗)14.3 克硝酸钾(分几次加入),然后在温度 0 到 -5℃时,由滴液漏斗慢慢加入 14.5 克间氯苯甲醛。在 0℃下搅拌 2 小时,再在室温搅拌 1 小时,将反应混合物倒到碎冰屑上,所得悬浮液在冰箱内放置过夜。在布氏漏斗上过滤沉淀,用冷水洗涤到不呈酸性反应,在放有磷酸酐的真空干燥器内干燥,2-硝基-5-氯苯甲醛的产量是 24.9 克,熔点 69℃,此产物可不经纯化就用于下一个阶段。

第三阶段 制备 2-硝基-5-氯苯甲酸

氧化作用是在 1 升容量的三颈圆底烧瓶内进行的。烧瓶内装有搅拌器,回流冷凝管和滴液漏斗,在烧瓶内加入 360 毫升水,加 24.9 克 2-硝基-5-氯苯甲醛,加热搅拌。向熔化的 2-硝基-5-氯苯甲醛(70℃左右)添加 5% 高锰酸钾水溶液,直到氧化完全,检验是否氧化完全是根据点上几滴反应混合物到滤纸上,看其是否有颜色来判断。在充分氧化时,滤纸上二氧化锰斑点中心的外围湿环被染上淡红色。而在不完全氧化时几乎无色。将热反应的混合物在布氏漏斗上过滤除去二氧化锰,滤液(亮黄色)用盐酸酸化后在冰箱中

放置过夜。在布氏漏斗中吸滤，沉淀用冷水洗涤和在真空干燥器干燥。得到19.3克 2-硝基-5-氯苯甲酸，其熔点为 $124\sim 129^{\circ}\text{C}$ 。母液在分液漏斗中用乙醚抽提，乙醚抽提液用无水硫酸钠干燥，蒸发掉乙醚，这样又可得到 3.8 克 2-硝基-5-氯苯甲酸。总产量是占理论值的86%，为了纯化2-硝基-5-氯苯甲酸，可以在甲苯中重结晶。

将所得的 2-硝基-5-氯苯甲酸(熔点 136°C)进行进一步精制。

第四阶段 制备 5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸

6 克 2-硝基-5-氯苯(甲)酸放到烧瓶内，加入 150 毫升水，在搅拌下由滴液漏斗逐滴添加 20% NaOH 水溶液到 pH 7.2 (根据 pH 试纸)。在这 pH 下所有的 5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸都溶解，通过滴液漏斗加入溶解在 30 毫升水内的 7.4 克结晶硫化钠 ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)。所得溶液在 50°C 保温 2 小时，在搅拌下向此溶液逐滴加入溶在碘化钾中的碘液 (4 克 I_2 溶在 100 毫升 KI 溶液内) 进行氧化，直到反应溶液呈现橙黄色(此颜色是由硫酚盐的阴离子所决定的)，不再变为淡黄色(二硫化物)为止。反应混合物用 100 毫升盐酸酸化(1:1)。析出的油状物在搅拌下很快结晶，把此物质吸干，用水洗涤和用真空泵干燥，5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸的产量为 4.9 克(占理论值的 41.5%)；它的结晶是深棕色的。

为了纯化可把此酸在冰醋酸中二次重结晶，重结晶后变为淡黄色的结晶粉末，其熔点为 $237\sim 238^{\circ}\text{C}$ (已有分解)，中和作用的当量：计算值是 198，实际值 190。

为了测定中和作用的当量，准确称取 5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸在相当于理论值 2 倍体积的 0.01N NaOH 溶液内加热溶解。所得溶液用 0.01N HCl 或者 H_2SO_4 进行滴定，以溴百里酚蓝作为指示剂。不能直接用 0.01N NaOH 溶液滴定，因为 5,5'-二硫代二(2-硝基苯(甲))酸与稀碱溶液反应很慢。

测定蛋白质中—SH 基的步骤

向试样管中加入 3 毫升蛋白质溶液, 2 毫升 0.2M 磷酸缓冲液 (pH8.0) 和 5 毫升水, 最终体积为 10 毫升 (试样管 A)。加入试样管蛋白质的量决定于蛋白质中—SH 基的含量。例如, 用大白鼠单胺氧化酶纯化的制剂进行工作时, 此制剂—SH 基的含量大约是 $8 \text{ M—SH 基}/10^5 \text{ 克蛋白质}$ 。那么 A 试样管中加入 1~0.5 毫克蛋白质就够了。

从试样管 A 中吸出 3 毫升, 用微量吸管向它添加 0.02 毫升 Ellman 试剂。迅速的振摇试样管, 此时出现黄色, 2 分钟后用分光光度计在 412nm 波长下测其光密度。用这种方式能够测定蛋白质中能迅速起反应的—SH 基 (Ю. М. Торчинский, 1971)。如果在研究的蛋白质中具有缓慢反应的—SH 基, 那么要经过较长的时间才出现颜色。每经过 5 分钟测定一次光密度, 一直到它的数值不再恒定为止。测定实验试样管的光密度值时以 0.02 毫升水代替 Ellman 试剂作为对照管。

可以按下式计算巯基的含量:

$$C_o = \frac{A}{\varepsilon} \cdot D,$$

此处 C_o ——要求的—SH 基的浓度 (M/l); A ——反应完全后实验试样光密度的增加; ε ——TNPA 克分子消光系数 ($\varepsilon = 11400$); D ——稀释倍数。

例如, 试样管与 Ellman 试剂一起保温后光密度的增加是 0.087。那么

$$C_o = \frac{0.087}{11400} \times \frac{10}{3} \times \frac{3.02}{3}$$

$$C_o = 2.54 \times 10^{-5} \text{ M}$$

进一步计算每一克分子蛋白质的—SH基含量,如果不知道蛋白质的分子量,那么按 10^5 克蛋白质计算。在我们情况下,在 1 升所研究的溶液内含有 0.31 克蛋白质,那么在 10^5 克蛋白质中—SH基的相应含量将等于

$$\frac{2.54 \times 10^{-5} M \times 10^5 \text{ 克}}{0.31 \text{ 克}} = 8.2 M \text{—SH基}/10^5 \text{ 克蛋白质}$$

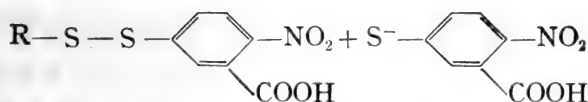
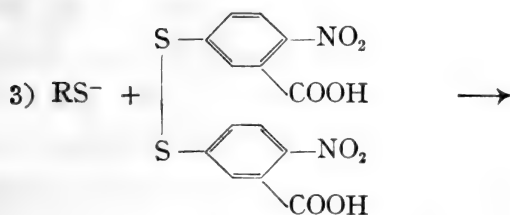
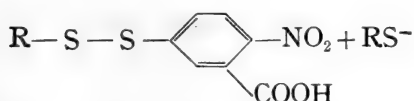
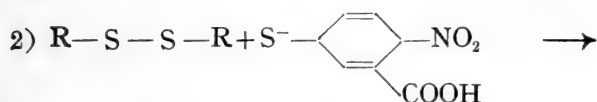
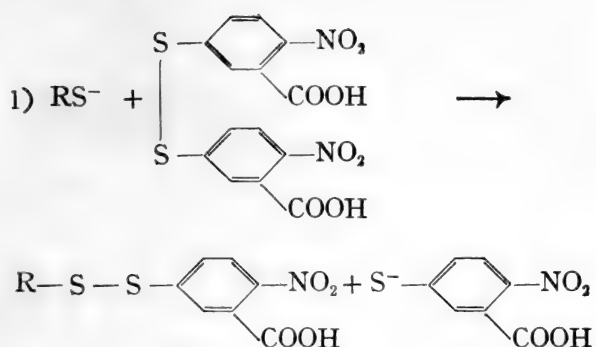
如果用不溶性蛋白质(例如,线粒体或者微粒体悬浮液)预先必须使蛋白质增加溶解度。为了把悬浮的蛋白质进行溶解,在 1 毫升约含有 2 毫克蛋白质的溶液中添加 25% 非离子去垢剂 OP-10,使其最终浓度为 1%。将试样管混匀,在室温中放置一小时。在试样中如有比较高浓度的去垢剂 OP-10 (2% 或者更高) 或者 1% Triton X-100, 被 Ellman 试剂滴定的一SH基的数值就会降低。在下列情况下不能采用 Ellman 法 (Butterworth et. al., 1967):

1) 当滴定隐蔽的一SH基时,因为蛋白质与 Ellman 试剂长时间保温可能使 Ellman 试剂自发氧化。在这种情况下建议向试样A中加入尿素至最终浓度为 8M。为此,将 4.8 克重结晶尿素溶解在 2 毫升 0.2 M Tris-缓冲液中(pH 8.0),加入 3 毫升被研究的蛋白质溶液,加水使试样管的体积达到 10 毫升,进一步的测定按如上所述; 2) 当用有色的蛋白质进行研究时,特别是色素蛋白; 3) 为了酶的稳定或激活而利用巯基化合物时(例如, 2-巯基乙醇),—SH基的滴定,只有除去巯基化合物后才有可能。

测定蛋白质中的二硫键

方法的原理

如果在蛋白质中除了—SH基外,还存在—S—S—基,那么DTNBA可能同后者相互作用。此时反应按下面图解进行 (Robyt et al., 1971)



当有二巯基苏糖醇存在下或者在 pH 10.5 情况下所形成的二硫化合物(反应式 1~3 右半部分)将分解而生成 TNPA。比较一下添加二巯基苏糖醇(或者 pH 达到 10.5)前后游离的 TNPA 的含量,即可测定蛋白质中二硫键的量。

试 剂

Tris-磷酸缓冲液(pH8.1), 1 M Tris 和 1M 磷酸盐混和。

0.01M 磷酸钾钠缓冲液(pH 8.1)。

0.1N HCl 溶液。

0.1N NaOH 溶液。

2m M Ellman 试剂溶液(DTNBA 的分子量是 396.4; 在 10 毫升中含 7.93 毫克)溶解在 0.01M 磷酸缓冲液内(pH8.1)。

0.02 mM 2-巯基乙醇溶液。

测 定 步 骤

如果被研究的蛋白质含有巯基和二巯基, 那么向 2 毫升—SH 基浓度为 $0.5-10 \times 10^{-5}$ 的蛋白质溶液添加 0.1 毫升 1M Tris-磷酸缓冲液(pH8.1)和 0.5 毫升 Ellman 试剂。显色后此 TNPA 是根据测定—SH 基一节中所说的反应测定 TNPA 的浓度, 然后向试样加入 0.1 N NaOH 溶液, 仔细地调 pH 到 10.5, 经过 1~2 分钟后(在此时间内 TNBA 从二硫化物中断裂下来(见反应 1~3), 添加 0.1 N HCl 溶液至 pH8.1。必须用 pH 计控制试样 pH 的变化, 同时必须用磁力搅拌器搅匀试样。调 pH 要进行得很快, 所以建议事先用一定量的 NaOH 和 HCl 进行反滴定。因为当 pH 10.5 时 DTNBA 会自发分解, 因此必须设只含 Ellman 试剂的对照试验。计算蛋白质中—SH 基的总含量后(游离—SH 基加由—S—S—键形成的一SH 基), —S—S—键的数目可以按下列公式计算:

$$\begin{aligned} \text{—S—S—基的浓度} = & \frac{1}{2} [(\text{在 pH10.5 时的 TNPA 浓度}) \\ & - (\text{至 pH10.5 时的 TNPA 浓度})] \end{aligned}$$

这个公式可用以下方式推算, 如果蛋白质中含有一个—SH 基和一个—S—S—键, 那么最初每一克分子蛋白质形成 1 克分子 TNPA, 当 pH 数值调 10.5 后, 又释放出 3 克分子 TNPA, 其中 1 克分子是游离—SH 基(见反应 1), 因此在减去以前在公式中要乘以系数 2。

测定不含有—SH 基的蛋白质中的一 S—S—基数目时, 向实验试样中添加 0.1 毫升 0.2mM 2-巯基乙醇后按上述方法进行反应。对照管只含有 Ellman 试剂, 2-巯基乙醇, 缓冲液和水。蛋白质溶液中的一 S—S—基含量可根据下面公式计算:

$$\text{—S—S—基浓度} = \frac{\text{在 pH 10.5 时(TNPA 浓度)} - (\text{对照})}{2}$$

生物多聚物经醋酸纤维素薄膜超过滤

Л. В. Воробьев, Р. И. Гвоздев

在分离酶、蛋白质和核酸的过程中, 往往得到的是浓度非常稀的生物多聚物。为了进一步研究必须把此稀溶液浓缩。已知浓缩生物高分子的方法有: 盐析作用、有机溶剂沉淀、透析袋内蒸发作用、将多聚物对高渗溶液进行透析等等。超过滤的方法是这些方法中最方便的方法之一, 这个方法能够在非常温和的条件下即在低温、广泛的 pH 范围内、溶液的任一离子强度下进行浓缩, 事实上是在没有溶剂的浓缩作用下完成生物高分子的浓缩的。因此应用本法引起的变性作用极小。

由于很难得到孔径大小合适的膜, 所以使这个方法的推广较慢。最近研制了一系列的方法, 由醋酸纤维素用干的或者湿的甲酰化作用的方法来制备薄膜。也用多聚阴离子或多聚阳离子来制备薄膜(商品名称为 Diaflex)。该工作是根据薄膜的湿的甲酰化

作用的方法(Van oss, Bronson, 1970)。

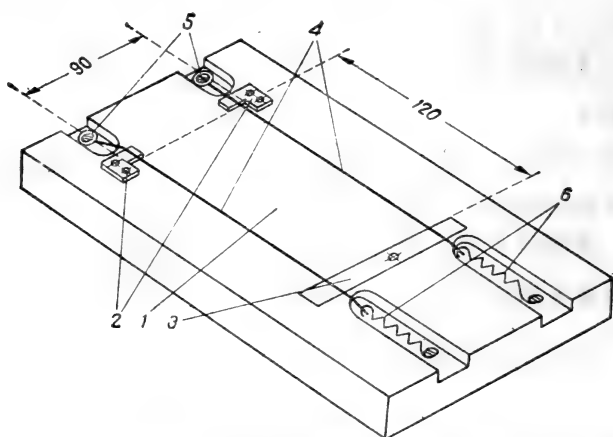


图 23 制备醋酸纤维素膜的装置

1——感光玻璃板; 2——角钢; 3——压板; 4——由金属丝制成的挡板; 5——固定螺丝; 6——伸缩弹簧

工作中利用纺织工业中应用的二醋酸酯纤维 (ГОСТ 12808-67)。为了制作纤维素膜采用如下原液的配方: 向 8 克二醋酸酯纤维素加入 52 毫升丙酮和 40 毫升甲酰胺。混合物在具有磨口塞子的烧瓶内在室温下放置过夜, 直到纤维素完全溶解。

为了制成薄膜应用洗去乳胶的感光玻璃板 (9×12 厘米), 将感光板装在如图 23 所示的特殊位置上。用二块角钢和压板将玻璃固定, 沿玻璃边缘由金属丝制成的挡板扣紧, 由装置在底座槽内的二个螺丝固定此金属丝, 连在金属丝挡板下部的伸缩弹簧将金属丝拉紧, 在更换玻璃时很易脱下挡板。改变金属丝的直径, 可以得到不同厚度的薄膜。在工作中采用了直径为 0.15, 0.20 和 0.25 毫米的金属丝并制成了同样厚度的薄膜。

用带有磨光的下口的移液管很快地将纤维素溶液 (2.5~3.5

毫升)以带状沿玻璃板上缘加到玻璃上,然后让感光板迅速而又均匀地来回移动,把溶液分布到整个玻璃的表面。为了使醋酸纤维素溶液分布均匀,可以应用任何合适的材料(玻璃,有机玻璃,不锈钢)制做薄板。为了薄板的边缘能沿金属丝挡板随意滑动,重要的是将薄板擦得很干净和磨得很光以保证所形成的薄膜有相同的厚度将铺上一层醋酸纤维素的玻璃立刻浸没到冷至 0°C 的水中,经过 30~40 分钟后,将膜从玻璃上揭下,即可应用。所得的膜是各向异性的,要在它的左下角打孔以区分膜的上面和下面。制备好的薄膜保存在 40°C 10~15% 甲醇溶液内。为了完全除去丙酮和甲酰胺,在工作之前把薄膜在大量的蒸馏水中加热到 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ (升温过程不应少于 30 分钟)溶剂若不除尽,可能在以后会导致被浓缩的蛋白质变性。

用于蛋白质超过滤的仪器,其大小可根据被浓缩溶液的体积大小而变化。仪器的结构要能使膜紧密固定和创造对超过滤必需的压力降(图 24)。根据装置的大小,截取膜的圆面,将它放到由多孔塑料或者多孔金属(孔的大小 1~10 毫微米)制成的支持板上。因为所得的薄膜是各向异性的,重要的是要使薄膜的上面朝着被浓缩的蛋白质溶液的上表面。用有机玻璃杯将膜蒙起来,均匀地和紧密地用三个压紧螺帽夹住。必须用橡皮垫把它密封。为了防止膜孔被生物多聚物堵塞,超过滤的速度要很慢,可用悬挂式的磁搅拌器搅匀溶液。

经过仪器上部的橡皮垫注入待浓缩的蛋白质溶液,并插入一枝与有剩余压力源装置相联结的针。

当用对氧敏感的酶进行工作时,超过滤作用应在无氧的条件下进行。为此内部空间用缓冲液充满,在缓冲液中通惰性气体 10~25 分钟。用于排出气体的附加针管也经过这个上部的衬垫。除去氧后把缓冲液通过膜将它压出,同时也就把氧从膜的下面排

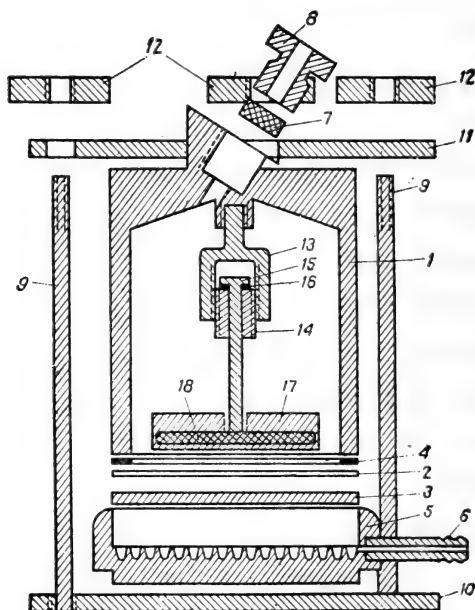


图 24 生物聚合物超过滤的装置

1——杯子；2——超过滤的膜；3——有许多小孔的薄板；4——橡皮垫；厚度 0.5~1.0 毫米；5——带有接受器的夹紧装置的压板；6——排水套管；7——真空橡皮衬垫，厚度 6 毫米；8——压板螺帽；9——压板螺钉；10——带有压板螺钉的不锈钢架子；11——由不锈钢制成的压板盖；12——压板螺帽；13——支架；14——支架的套管；15——搅拌器的支架；16——衬垫；17——带有磁棒的磁搅拌器；18——搅拌器磁棒

1, 5, 6, 8, 13, 17——是由有机玻璃制成；9, 10, 11, 12——是由不锈钢制成；14, 16——聚四氟乙烯（塑料）制成。1 的杯子表面和带有一道接受器 5 的压板应该磨光到发亮的状态

除出去。仪器通过注射器注入氩、氮、氦而产生高压。

对不同厚度的膜(0.15, 0.20 和 0.25 毫米) 进行比较后证明：最薄的薄膜具有最快的过滤速度。用蒸馏水测定时，当压力为 1 个大气压时，通过厚为 0.15mm 的薄膜过滤的比速度为 0.10~0.15 毫升/厘米²·分钟。

当把压力提高到 2 个大气压时, 过滤速度比原来增加 $1/2 \sim 1/3$ 。当增加到 3 个大气压时, 增加 $1/4 \sim 1/6$ 。当 4 个大气压时, 增加 $1/8 \sim 1/10$ 。因此在全部时间内过滤速度的增加是跟不上压力的增长的, 而当压力增加超过 4 个大气压时, 实际上是不合算的, 因为这不会再使液体流速有显著的提高。比较不同批号的膜发现数据很不相同(50~70%), 看来这是手工制备的膜所难免的。

为了检验膜, 应用有色的蛋白质——血红蛋白溶液作为标准蛋白质溶液, 很易观察超过滤的过程。把血红蛋白原有的浓度与在滤液中的浓度相比较, 证明了通过膜的血红蛋白不超过 1.5~2%, 也就是说膜几乎完全阻留了血红蛋白。在恒定的压力下血红蛋白溶液超过滤的速度, 随着时间逐渐降低, 直到某一恒定的水平(这一水平是水滤过速度的 $1/5 \sim 1/8$), 以后实际上保持恒定, 直到蛋白质溶液浓缩至糊状形式的状态。

在提高压力情况下, 血红蛋白溶液超过滤的速度短时期是能加快的, 但很快速度就逐渐减慢, 这是与膜孔堵塞有关。压力超过 2~2.5 大气压时, 实际上不能再提高此过程的速度, 在压力为 2 个大气压时血红蛋白超过滤的速度是 0.07 毫升/厘米²·分钟。

由实验结果可见, 超过滤的速度随着膜的厚度降低而上升。但是当薄膜厚度小于 0.1 毫米时, 它的机械性能逐渐破坏到无法再使用。因此利用机械性能牢固的载体看来是很有前途的, 在这种载体上可以放上过滤材料的极薄的膜。

改变醋酸纤维素浓度, 能够制备具有各种不同孔径的膜。应用醋酸纤维的浓溶液能制备出小孔径的薄膜, 而用稀溶液能制成具有大孔径的薄膜。因此, 利用这一点能制备出具有一定大小孔径的薄膜, 应用此薄膜能使生物聚合物按其分子量大小在超过滤上以非常快的速度来进行分级分离。

鱼精蛋白硫酸盐商品制剂的纯化和利用它们 来提取核酸、酸性和碱性蛋白

Р. И. Гвоздев, А. В. Татьянаенко,

З. П. Белова, А. П. Садков

鱼精蛋白是分子量为 4000~10000 的蛋白质, 故它们易透过半透膜。组成鱼精蛋白的总共只有几种氨基酸, 且基本组成(80~90%, 决定于蛋白质的来源)是精氨酸, 因此鱼精蛋白呈碱性。除此之外, 这些蛋白质有少量的单氨基酸和脯氨酸, 但不含有酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸 (Murray, 1965)。

鱼精蛋白能与核酸形成复合物, 并以这种复合物形式存在于动物细胞内。这些复合物易在稀酸溶液中 (H_2SO_4 , HCl 等) 解离形成鱼精蛋白硫酸盐, 鱼精蛋白盐酸盐等。这个方法用来从鱼的精子中提取鱼精蛋白。鱼精蛋白硫酸盐或者鱼精蛋白盐酸盐进一步的纯化是通过苦味酸盐或者重金属盐和有机溶剂 (酒精或者丙酮) 多次反复的沉淀, 以此方式所得的鱼精蛋白经冷冻干燥后是白色粉末 (Felix, 1960)。通常鱼精蛋白的商品制剂是粉末状的。一般地说, 这些商品制剂含有几种蛋白质组分, 这些组分可按分子量、氨基酸组成和其他理化性质的不同来加以区分。

鱼精蛋白的纯化

配制 10% 鱼精蛋白硫酸盐商品制剂 (捷克 «Spofa» 或者 «Weddel pharmaceutical» 英国) 溶于 0.01 M Tris-HCl 缓冲液内 (pH 6.0) 加热到 30~40°C。溶液用 5 M KOH 溶液中和到 pH 6.0, 不溶性物质在 20~30°C 5000g 离心 10~15 分钟除去。上清液部分在 Sephadex G-25 或者 G-50 凝胶柱 (3×50 厘米或者 5×

50 厘米)进行分级分离, 鱼精蛋白可用 0.5m M Tris-HCl 缓冲液 (pH6.0)洗脱, 鱼精蛋白洗脱图谱可随每批鱼精蛋白硫酸盐而有显著改变。在鱼精蛋白商品制剂 («Spofa») 分级分离时通常分离出三个蛋白质组分(*I*, *II*和*III*) 和一个非蛋白质来源的*IV*组分(图 25)。为了使这些组分进一步纯化, 把它们中每一组分重新进行凝胶过滤。将蛋白质组分(即洗脱曲线(280nm)上一定的峰位部分)真空干燥, 溶于水内和重复进行凝胶过滤。组分 *I* 的 $OD_{280/260}$ 的比值是 1.01, 组分 *II* 是 0.96, 组分 *III* 是 0.94。

在 7% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳时, 在所得的三个蛋白质组分的任何一个组分中都发现有一个 R_f 值相同的一个区带, 这很可能不是由于这三个组分的电泳迁移率相同而造成的, 而是由于对分级分离鱼精蛋白来说凝胶的浓度太低所引起的。

«Weddel pharmaceutical» 公司出品的鱼精蛋白硫酸盐在低浓度(1%)时, 用 Sephadex 柱上分级分离时得到一个峰(见图 25)。但是用 10% 溶液分级分离时观察到 2~3 个组分。在洗脱曲线中这些峰的形状和位置在各个实验中都不能重复, 这可能表明在高浓度鱼精蛋白时, 鱼精蛋白制剂与 Sephadex 凝胶之间有部分的相互作用。 $D_{280/260}$ 的比值对纯化的制剂是 0.98。

可用纯化的鱼精蛋白组分来比较研究 *Azotobacter vinelandii* 无细胞制剂核酸和酸性蛋白质沉淀的程度。无细胞制剂是通过半自动化的粉碎机破坏细菌细胞而得到的, 无细胞制剂在 65000g 离心 1 小时。进一步工作中利用上清液含有 30~40 毫克蛋白质组分 (组分 H 65-1), 每毫升和 5% 鱼精蛋白水溶液。未经过纯化的 «Spofa» 公司的精蛋白制剂能部分地沉淀核酸而不沉淀酸性蛋白。所有三个纯化组分都能沉淀核酸, 其沉淀次序的强度为: 小 $I > II > III$ 。组分 *III* 不沉淀酸性蛋白质, 组分 *I* 沉淀酸性蛋白的能力比组分 *II* 大 2~5 倍。所得鱼精蛋白的三个组分

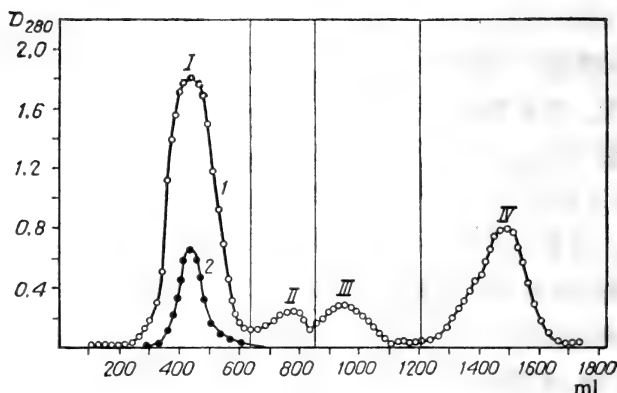


图 25 鱼精蛋白硫酸盐制剂经 Sephadex G-25 凝胶过滤

1——«Spofa»公司制剂；2——«Weddel pharmaceutical»公司制剂
纵座标——在波长 280 nm 下的光密度；横座标——洗脱体积(毫升)

在沉淀核酸和酸性蛋白程度上是有差异的，看来这是由于精氨酸含量的不同所决定的。

虽然 «Weddel pharmaceutical» 公司出品的精蛋白硫酸盐在 G-25 Sephadex 柱上分级分离时在洗脱曲线内只存在一个峰，没有纯化的制剂沉淀核酸和酸性蛋白的程度比经过凝胶过滤的同样制剂要低 $1\frac{1}{2} \sim 2$ 倍。

用凝胶过滤纯化的鱼精蛋白硫酸盐，比过去报导 (Phillips West, 1964) 用 DEAE-纤维素层析纯化的鱼精蛋白硫酸盐能更好地沉淀核酸和酸性蛋白质。

应用鱼精蛋白来分离核酸及酸性和碱性蛋白

图 26 所示的材料是用鱼精蛋白来分级分离 *Azotobacter vinelandii* 无细胞制剂的核酸，酸性和碱性蛋白。在提取核酸时，用鱼精蛋白硫酸盐滴定到 $D_{280/260}$ 大于 1 时 (核酸组分)，滴定应

该停止。核酸和鱼精蛋白不溶性的复合物易用离心方法分开，其条件是 $3000 \sim 5000g$ $10 \sim 15$ 分钟。在进一步滴定时形成鱼精蛋白硫酸盐和酸性蛋白的不溶性复合物，此复合物同样易在 $3000 \sim 5000g$ $10 \sim 15$ 分钟离心分开(酸性蛋白组分)。

上清液组分含有碱性蛋白，继续添加鱼精蛋白硫酸盐也不再沉淀(碱性蛋白组分)。

为了得到溶解状态的核酸，核酸组分的沉淀悬浮在 $0.01 \sim 0.02M$ 缓冲液中($pH 6 \sim 8$)，用离心沉淀。这一步骤进行二次。以这种方式洗涤过的沉淀悬浮在 $0.05 \sim 0.1 M$ 盐酸或者硫酸溶液内。

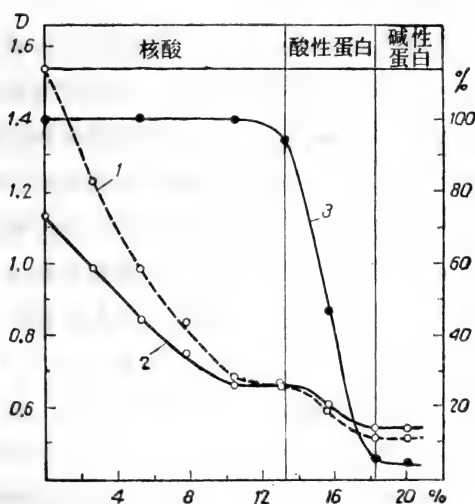


图 26 用鱼精蛋白硫酸盐滴定 *Azotobacter vinelandii* 粗无细胞制剂
1——在 260 nm 的吸收; 2——在 280 nm 的吸收; 3——固氮酶的活力, 是按 В. А. Ивлев 等的方法 (1971) 根据在压力为 0.05 毫米水银柱下 H_2 的释放测定的

纵座标——光密度(曲线 1 和 2)和固氮酶活力的百分比(曲线 3); 横座标——添加鱼精蛋白硫酸盐的浓度(占无细胞制剂蛋白质的百分比)

为了得到的酸性蛋白组分呈溶解状态，把酸性蛋白组分与磷酸纤维素一起悬浮。商品磷酸纤维素在 0.5 M NaOH 溶液内用磁力搅拌器搅拌 $15\sim 20$ 分钟，用水洗涤，在 0.5 M HCl 溶液中搅拌 $15\sim 20$ 分钟，用水洗涤，然后用 0.01 M 缓冲液 ($\text{pH}6.5\sim 8.0$) 洗涤，直到所需的 pH 值。同磷酸纤维素形成较牢固的复合物的鱼精蛋白可用离心 ($10000\sim 20000\text{g}$, $20\sim 25$ 分钟) 与磷酸纤维素一起除去，或用过滤与磷酸纤维素一起除去。酸性蛋白存留于上清液组分或者滤液中。为了完全结合鱼精蛋白所需的磷酸纤维素的量可根据滴定来选取。

为了得到碱性蛋白，可用过量的鱼精蛋白硫酸盐完全除去过多的核酸和酸性蛋白，如图 26 所示。

当用上述的条件进行分级分离时，核酸的组分中含有少量的蛋白质，而在酸性蛋白组分中的酸性蛋白（例如固氮酶，见图 26）与原始材料相比纯化了 $4\sim 6$ 倍，纯化的结果能很好的重复。

应该考虑到，鱼精蛋白硫酸盐同核酸和酸性蛋白形成不溶性的复合物，是由核酸的磷酸基和蛋白质的羧基同鱼精蛋白硫酸盐的精氨酸上的氨基之间形成离子键之故，因此当溶液的离子强度增高时，在精氨酸上的 NH_2 —基和磷酸基与羧基相互之间形成离子键的程度显著降低。在高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (高于 0.5 M) 时一般没有看到酸性蛋白同鱼精蛋白形成不溶性复合物，甚至添加大大过量的鱼精蛋白时也如此。

因此要使应用鱼精蛋白硫酸盐定量地沉淀核酸和酸性蛋白的结果能够重复，必须遵守两个条件：1) 含有鱼精蛋白硫酸盐的组分能高程度地同酸性蛋白形成复合物；2) 鱼精蛋白和无细胞制剂的原始蛋白质溶液应该有比较低的离子强度。

血红蛋白的醋酸纤维素电泳

О. В. Троицкая

在患血红蛋白异常症时(溶血性贫血症)血象和临床的症状与许多其它疾病相类似,因此在鉴别诊断血红蛋白疾病时,血红蛋白的电泳研究有很大的意义。

血红蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳(Graham, Grunbaum, 1963; Sulis, et al., 1968)是检出血红蛋白疾病最快速和最简便的方法。无论是发现异常的血红蛋白,或者是在检出 β -地中海贫血症杂合子携带者时定量测定 Hb A₂ 都能应用此方法。

试剂和仪器

用于电泳的醋酸纤维素薄膜。

带状醋酸纤维素电泳仪, 型号 ЭФПА 250~0.05。

电泳缓冲液(pH8.9)成分为:

Tris(三羟甲基氨基甲烷)	12 克
特里龙 B(一种氨羧络合剂)	1.56g
硼酸	0.92 克
水	至 1 升

蛋白质染色用氨基黑溶液的成分:

氨基黑 10B	10g
三氯乙酸	30g
磺基水杨酸	30g
水	至 1 升

染色后洗涤染色带用溶液的成分:

甲醇(或者乙醇)

冰醋酸

水

含正铁血红素化合物染色用的联苯胺溶液的成分:

联苯胺	0.2g	500 毫升
醋酸	0.5 毫升	100 毫升
水	100 毫升	400 毫升

使用前添加 0.2 毫升 30% 过氧化氢:

洗脱液——80% 醋酸。

薄膜透明液:

- 1) 凡士林油
- 2) 醋酸 10 毫升和甲醇 90 毫升。

制备红血球溶解物

全血放到含有肝素的试管内, 1000g 离心 15~20 分钟, 离心液弃去, 红血球用 3 倍体积的生理盐水洗三次, 仔细地搅匀, 1000g 离心 15~20 分钟。向红血球添加等体积的水和 4~5 滴氯仿, 然后把混合物剧烈的搅匀 5 分钟, 1000g 下离心 1 小时, 红血球溶解物(上层)用毛细管吸出保存于封口的小瓶内, 放入冰箱保存。

电 泳

将几条醋酸纤维素薄膜放到缓冲液的表面上(毛面朝上), 使它漂浮在上面, 经过 1~2 分钟, 薄膜完全沉到溶液内, 浸泡 10 分钟, 然后把条带夹在二层滤纸之间, 小心地除去多余的缓冲液, 被缓冲液润湿了的条带放到电泳槽中, 借助于仪器中专门的转轴很好地将它拉紧, 打开开关, 在工作电压为 250V 下电泳 10 分钟, 然后切断电源, 点样。

用由有机玻璃制的专门的点样器(带有细齿(刷子状)的薄片)

点样。在一条醋酸纤维素膜上可以点上一个样品,使其占满整个薄膜的宽度,也可以并排的点上二份甚至三份样品,以便于对不同的样品进行比较。点样的体积是由点样器决定的。在红血球溶解物中血红蛋白浓度为 10~15% 时,通常在一条带上点上约 1~2 微升红血球溶解物就够了。如果红血球溶解物的浓度由于某种原因很低,那么可以点二次,但一定要完全点在同一位置上。

在 250V 电压下电泳 2 小时 (5 条条带电流总强度是 2~6 mA), 在 ЭФЛA 250~0.05 电泳仪上总共能放 10 条条带——二个槽每槽放五条。电泳结束后,把醋酸纤维素膜放到氨基黑溶液中 10 分钟使蛋白质区带染色,然后放到洗涤液中,洗涤液要更换好几次,一直洗到洗涤液不出现颜色为止。然后将薄膜浸入水内 15~20 分钟,把薄膜夹在两张滤纸中压紧使干燥。

用联苯胺显色血红蛋白区带时,电泳后把条带放在联苯胺试剂中。在显色前将过氧化氢加入试剂中。30 分钟内显色。血红蛋白呈浅蓝色,然后又变成褐色。把条带放到水中,然后把其夹在两张滤纸中间压紧使干,不含正铁血红素的蛋白质联苯胺试剂不显色。

条带的透明

可用光密度计测定各个组分,但必须预先使纤维素薄膜透明。可用几种方法: 1) 将干的薄膜放到凡士林油中,用滤纸把油吸干后夹在二块玻璃内,除去多余的空气; 2) 将薄膜在无水甲醇中浸 2 分钟后放到用无水甲醇配制的 10% 醋酸溶液中, 30~60 秒钟(不应超过)。然后薄膜在玻璃板上用玻棒滚压,除去气泡,放到 70~80°C 烘箱内直至完全干燥。

结果的解释

正常的红血球溶解物组分(图 27, A) 在电泳谱上是以下列方

式分布：开头有二个不大的区带是非血红蛋白(X-蛋白)，从基线开始的第一条区带染色比第二区带弱。紧接非血红蛋白后面出现的是 HbA₂ 区带。然后是经常可看到的很狭的 HbF 区带。再以后是染色很深的 HbA 区带。最后是与 HbA 区带相连的染色较浅的 HbA₃ 区带。

非血红蛋白组分对于诊断血红蛋白疾病是没有意义的。为了防止把非血红蛋白带条看作是 HbA₂ 区带，建议采用联苯胺染色。非血红蛋白不能用联苯胺染色，而 HbA₂ 则象血红蛋白所有其余的组分一样被联苯胺染成浅蓝色。HbA₃ 组分的来源还不清楚，它也不能用于诊断，在定量测定时它与 HbA 组分连在一起。图 27 B 是异合子携带者的 HbS 各组分分布的图谱。

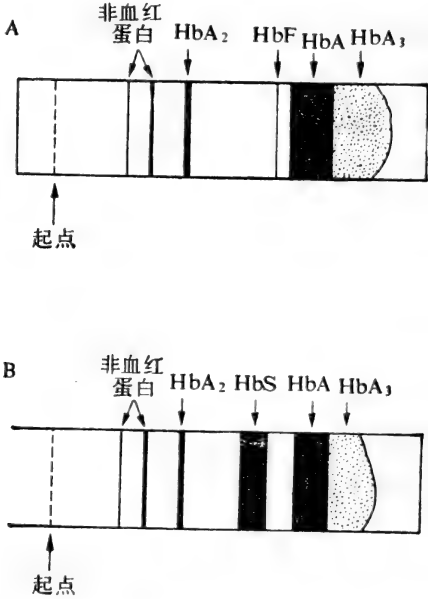


图 27 在醋酸纤维素膜电泳上人血红蛋白分布区带图谱
A——正常人；B——异合子携带者 HbS

在鉴定血红蛋白异常组分时，最方便的是在同一张薄膜上平行的点样。为了同所研究的血红蛋白进行比较作为对照的是用正常的血红蛋白或者已知其异常的血红蛋白。甚至在同一试验中在不同薄膜上所得的电泳图谱，要进行彼此之间的比较也是困难的。

HbA₂ 和血红蛋白的其他组分的定量测定

测定 HbA₂ 百分含量在诊断地中海贫血症上有很大意义。为了测定 HbA₂ 的含量可以将薄膜透明后进行光密度测量。如没有光密度计可利用洗脱技术，用此法所得结果的正确度也不低。

为了定量测定，把用氨基黑染色后的 HbA₂ 和 HbA 组分的醋酸纤维素条带剪碎，把它们分别放到试管内，每管添加 80% 醋酸，在 HbA₂ 管和对照管内每管添加 4 毫升，而在 HbA 管内添加 20 毫升，用与 HbA₂ 区带同样大小的空白醋酸纤维素条带作为对照。醋酸纤维素薄膜完全溶解在 80% 醋酸内，首先用玻棒小心地搅拌试管内容物，然后倒出抽提液，以空白管作为对照。在 CФ-4 分光光度计上波长 610 nm 进行测定，计算公式：

$$\text{HbA}_2\% = \frac{D_{\text{HbA}}}{D_{\text{HbA}_2} + 5D_{\text{HbA}}} \times 100$$

D——是相应试样在 610 nm 波长下的光密度值。

HbA₂ 正常的含量平均值是 1.5~2.5%，如果 HbA₂ 百分含量超过 3~4%，那么可认为是高的，可作为推测有地中海贫血症的根据。在异常血红蛋白杂合子携带者情况下，例如 S 型的血红蛋白，用醋酸纤维素薄膜电泳不仅能够测定是 HbA₂ 百分含量，而且能测定正常组分(HbA)和病理组分(HbS)的百分含量。在这种情况下把含有 HbA₂、HbS 和 HbA 组分的相应区带切下剪碎，分别放到各个试管中，有 HbA₂ 的试管和对照管各加入 4 毫升 80% 醋酸，而有 HbS 和 HbA 的试管各加入 10 毫升 80% 醋酸，试样在

光度计上测定后根据下列公式计算其含量:

$$\text{HbA}_2\% = \frac{D_{\text{HbA}_2}}{D_{\text{HbA}_2} + 2.5D_{\text{HbS}} + 2.5D_{\text{HbA}}} \times 100$$

$$\text{HbS}\% = \frac{2.5D_{\text{HbS}}}{D_{\text{HbA}_2} + 2.5D_{\text{HbS}} + 2.5D_{\text{HbA}}} \times 100$$

$$\text{HbA}\% = \frac{2.5D_{\text{HbA}}}{D_{\text{HbA}_2} + 2.5D_{\text{HbS}} + 2.5D_{\text{HbA}}} \times 100$$

用醋酸纤维素膜电泳测定杂合子携带者HbS的血红蛋白各组分平均比例为: HbA₂—3%, HbS—35~40%, HbA—55~60%。

必须指出, 在测定电解中移动缓慢的血红蛋白异常组分情况下(HbS和HbD)测定HbA₂百分含量所得的结果可以人为地偏高, 这是由于含有痕量的这些移动缓慢的组分所引起的。存在血红蛋白E的情况下, 由于它的电泳迁移率与HbA₂一样, 所以要测定HbA₂的含量是不可能的。

方法的评价

醋酸纤维素薄膜电泳是一个快速和便于检出血红蛋白疾病的方法。醋酸纤维素电泳仪体积不大, 甚至在普查时也可应用。在诊断β-乳糖血症时醋酸纤维素电泳是一个非常好的方法, 因为此时测定HbA₂的含量是最理想的诊断试验。但是用醋酸纤维素膜电泳不能定量的测定出HbF, 因为它的含量相当低(平均为1%)。因此在醋酸纤维电泳上所得的血红蛋白相对组成成分的数据必须用胎儿血红蛋白的定量测定作为补充(T. В. Дервиз, 1969)。当有异常的血蛋白存在时, 用醋酸纤维素膜电泳作鉴别诊断时, 最好用其它高分辨力的电泳方法作为补充(如聚丙烯酰胺和淀粉凝胶电泳), 这些方法能显示电泳迁移率上更细微的差异。

用超离心法分离人血清脂蛋白的组分

Е. Н. Левитова

脂蛋白是血清组分之一,它承担机体内脂肪的运输,并参加生物体一系列重要的代谢反应。在动脉粥样硬化中,从病理发生的观点来说,研究这些复合物是很有意义的。由于各方面研究脂蛋白的必要性,有必要来制订分离脂蛋白的不同方法。这些方法中得到最广泛应用的是超离心法提取血清脂蛋白。此法是基于各种脂蛋白颗粒大小和密度上的不同。改变溶剂的密度,离心的转速和时间可以分离脂蛋白的不同组分 (Lindgren, Jensen, 1972)。下面所述是根据 Gustafson 及其同事 (1965) 和 Havel 及其同事 (1955) 工作的方法,可以从人血清中分离出乳糜微粒的 2 个亚组分 ($S_f > 5000$ 和 $400 \sim 5000S$), 从很低密度脂蛋白的 3 个亚组分, ($S_f 100 \sim 400$, $50 \sim 100$ 和 $20 \sim 50S$), 低密度脂蛋白的二个亚组分 ($S_f 12 \sim 20$ 和 $0 \sim 12S$) 和高密度的脂蛋白组分 ($F_{1.20} 0 \sim 9S$)。

溶液及其制备

(Korn, 1959; Gustafson et al., 1965)

1. 缓冲溶液 ($25^\circ C$ 时其密度为 1.0055 克/厘米^3)*: 1.42 克无水磷酸氢二钠, 7.27 克氯化钠和 0.1 克 EDTA-2Na 溶于蒸馏水内, 加水到 1 升, 用 $1N$ 盐酸溶液调节 pH 到 7。
2. 密度为 1.006 克/厘米^3 的溶液: 9 克 NaCl 溶解在蒸馏水内, 加水至溶液体积为 1 升。
3. 密度为 1.35 克/厘米^3 的溶液: 153 克 NaCl 和 354 克 KBr 溶解在蒸馏水内, 加水至溶液体积为 1 升。

* 根据 SI 系统密度以 10^3 千克/米^3 表示。

4. 密度为 1.21 克/厘米³的溶液: 4 毫升密度为 1.006 克/厘米³的溶液同 6 毫升密度为 1.35 克/厘米³的溶液混合。

5. 密度为 1.063 克/厘米³的溶液: 10 毫升密度为 1.006 克/厘米³的溶液同 2 毫升密度为 1.35 克/厘米³的溶液混合。

6. 密度为 1.085 克/厘米³的溶液: 10 毫升密度为 1.006 克/厘米³的溶液同 3 毫升密度为 1.35 克/厘米³的溶液混合。

7. 密度为 1.019 克/厘米³的溶液: 10 毫升密度为 1.006 克/厘米³的溶液同 2 毫升密度为 1.085 克/厘米³的溶液混合。

建议向溶液 2 和 3 中各加入 0.1 克 EDTA-2Na (Lindgren, Jensen, 1972)。溶液的密度用比重法校正。

乳糜微粒的分离

乳糜微粒的特性是漂浮速度 $>400S$ 和水合密度为 0.93 克/厘米³, 因此它们在密度为 1.0055 克/厘米³的溶液中是漂浮的, 这一点可用于对他们的分离。改变离心的时间和离心力, 能够分离出 2 个乳糜微粒亚组分: $S_f > 5000S$ 和 $S_f 400 \sim 500S$ 。

$S_f > 5000S$ 的乳糜微粒亚组分的分离

将 5 毫升人的血清加到体积大于 10 毫升的离心管中。再向此管加入 5 毫升密度为 1.0055 克/厘米³的磷酸缓冲液。在 4°C 9500g 离心 10 分钟。为了进行这样的离心, 可用制备超离心机 «Beckman-Spinco» 30.2 型的转头, 离心管的体积是 10.5 毫升。把含有 $S_f > 5000S$ 的乳糜微粒的上层亚组分很小心地吸出, 体积为 5 毫升左右。可应用连有注射器的巴氏吸管吸取, 吸管的毛细管部分的直径是 1 毫米, 宽大部分的直径是 7 毫米。吸取时吸管的毛细管末端应该处于离心管壁弯月形液面水平上, 操作时轻轻地转动离心管。被分离出的乳糜微粒的亚组分与四倍量的密度为

1.0055 克/厘米³的缓冲溶液混和, 把它倒入离心管中, 重复的在相同条件下离心。洗涤被分离的亚组分除去与蛋白质混在一起的杂质。乳糜微粒亚组分集中在离心管的上部, 是一浑浊层。浑浊层的厚度决定于血清中这个亚组分的含量。把浑浊层小心地吸出和再重复洗涤亚组分 3 次。此时所分离的亚组分的体积逐渐减少, 它浓缩成越来越薄的一层。血清的沉淀物可用来分离其他组分。

S_f 400~5000 S 的乳糜微粒亚组分的分离

在大于 10 毫升体积的离心管内含有约 5 毫升的血清沉淀物, 小心地铺上一层密度为 1.0055 克/厘米³的缓冲液使管子装满 (约 5 毫升)。4°C 20000g 离心 30 分钟, 上层将近 5 毫升, 含有被提取的乳糜微粒亚组分。按上述那样小心地吸出。向提取出的亚组分加四倍量的密度为 1.0055 克/厘米³的溶液, 在同样条件下重复离心, 用密度为 1.0055 克/厘米³的缓冲液二次洗涤提取的亚组分。

很低密度的脂蛋白的分离

很低密度的脂蛋白组分包括漂浮速度从 20 到 400 S (在密度是 1.063 克/厘米³的体系中测定) 和水合密度为 1.01~1.09 克/厘米³的颗粒。与乳糜微粒一样, 这一组分在密度为 1.0055 克/厘米³的溶液中漂浮。利用这点可对它进行分离。增加离心力的速度和离心时间, 可以分离 3 个很低密度的脂蛋白亚组分, 其 S_f 值为 100~400, 50~100 和 20~50S。

S_f 100~400S 脂蛋白的亚组分的分离

用 5 毫升分离乳糜微粒后的血清残留物转移到体积略大于 10 毫升的干净的离心管中, 添加等体积密度为 1.0055 克/厘米³的缓冲溶液。4°C 80000g 离心 60 分钟。上层体积将近 5 毫升, 含有很

低密度的脂蛋白 $S_{f100\sim 400S}$ 。将它小心地吸出,添加四倍量的密度为 1.0055 克/厘米^3 的缓冲溶液后,在与上面相同条件下进行离心。把亚组分再重复洗涤和浓缩 2 次。

$S_{f50\sim 100S}$ 脂蛋白的亚组分的分离

向分离 $S_{f100\sim 400S}$ 的脂蛋白亚组分后剩下来的 5 毫升血清添加密度为 1.0055 克/厘米^3 的缓冲溶液,把离心管灌满,总的体积将近 13 毫升, 4°C $105000g$ 下离心 2 小时。最方便的是用制备离心机《Beckman-Spinco》40 型的转头,其离心管的体积是 13.5 毫升。上层体积将近 5 毫升,含有 $S_{f50\sim 100S}$ 脂蛋白亚组分,小心地吸出后与缓冲液混和,在相同条件下离心、洗涤和浓缩三次。

$S_{f20\sim 50S}$ 脂蛋白的亚组分的分离

在下层 5 毫升中(分离 $S_{f50\sim 100S}$ 后留下来的血清)加入密度为 1.0055 克/厘米^3 的缓冲液使离心管灌满,总体积将近 13 毫升。 4°C $105000g$ 下离心 22 小时。为此目的,可用制备离心机《Beckman-Spinco》40 型的转头,淡黄色的上层含有被分离的亚组分,小心吸出,添加密度为 1.0055 克/厘米^3 的缓冲液,重复离心。洗涤和浓缩亚组分二次。

低密度脂蛋白的分离

低密度脂蛋白的特性是漂浮速度为 $0\sim 20S$ (在密度为 1.063 克/厘米^3 的体系中测定),和水合密度为 $1.01\sim 1.05 \text{ 克/厘米}^3$ 。已分离出二个低密度脂蛋白的亚组分: $S_{f12\sim 20}$ 和 $0\sim 12S$ 。

$S_{f12\sim 20S}$ 脂蛋白亚组分的分离

$S_{f12\sim 20S}$ 低密度脂蛋白亚组分在密度为 1.019 克/厘米^3 的溶

液中漂浮。为了分离上述的亚组分,把5毫升的下层(分离 $S_f > 20$ 组分后的血清残留物)与1毫升密度为 1.085 克/厘米^3 的溶液混合,所得的混合物倒入体积略大于6毫升的离心管内,用密度为 1.019 克/厘米^3 的溶液加满到它的顶部,很好地搅拌, $14 \sim 16^\circ\text{C}$ $114480g$ 离心18小时。为此目的,可利用制备离心机《Beckman-Spinco》40.3型转头,其离心管体积为6.5毫升。在这些条件下 $S_f 12 \sim 20S$ 的脂蛋白漂起,在离心管的上面形成黄色的一层。把这层小心地吸出。为了更完全的除去比较重的脂蛋白组分,将所分离的亚组分,用密度为 1.019 克/厘米^3 的溶液,在相同的条件下通过重复离心与吸出,将所分离的亚组分洗涤二次。

$S_f 0 \sim 12S$ 脂蛋白的亚组分的分离

$S_f 0 \sim 12S$ 低密度脂蛋白的亚组分在密度 1.063 克/厘米^3 的溶液中漂浮,为了分离这个亚组分,把分离 $S_f 12 \sim 20S$ 亚组分以后所留下来的3毫升下层与1毫升密度为 1.21 克/厘米^3 的溶液混合。所得的混合液倒入体积将近6毫升的离心管中,用密度为 1.063 克/厘米^3 的溶液加到离心管顶端。离心管内的溶液经充分搅拌后, $14 \sim 16^\circ\text{C}$ $114480g$ 离心18小时。橙黄色的上层是由 $S_f 0 \sim 12S$ 脂蛋白漂浮而形成的。小心吸出后添加密度为 1.063 克/厘米^3 的溶液,搅匀和重复在相同条件下离心。吸出所得到的脂蛋白亚组分。

高密度的脂蛋白组分的分离

高密度的脂蛋白的漂浮系数是 $0 \sim 9S$ (在密度为 1.20 克/厘米^3 体系中测定),水合密度是 1.08 至 1.16 克/厘米^3 。此组分的分离是在密度为 1.21 克/厘米^3 的溶液中进行的。向分离低密度脂蛋白亚组分后所剩下的下层4.5毫升添加 1.117 克 KBr 和 1.5 毫升蒸馏水,充分的搅匀,把此溶液的4.5毫升倒入体积将近6毫

升的离心管中,用密度为 1.21 克/厘米^3 的溶液加满到顶部,搅匀,在 $14\sim 16^\circ\text{C}$ $114480g$ 离心 22 小时,吸出上层,其体积为将近 1.5 毫升,含有高密度的脂蛋白,用密度为 1.21 克/厘米^3 的溶液,通过重复离心和吸出洗涤被分离的组分。

从菜豆种子中提取植物血球凝集素

И. М. Карманский

植物血球凝集素 (PHA) 是植物来源的具有生物学活性的蛋白质,它引起人和动物红血球的凝集以及胚性转化和周围淋巴细胞的有丝分裂。PHA 在医学上和在不同的生物学研究中得到广泛的应用。

下面将叙述我们所采用的从菜豆种子中提取 PHA 的方法 (И. М. Карманский, 1972)。这个方法是根据 Rigas 和 Johnson 的方法而来的 (1964)。提取的过程包括用酸提取、硫酸铵的分级分离,透析和丙酮的分级分离。

试 剂

浓 HCl。

0.1 M HCl 溶液; 0.15 M NaCl 溶液。

硫酸铵饱和溶液 ($\text{pH} 1.0$), 1 升溶液中含有 508 克硫酸铵和 85 毫升浓盐酸。

丙酮; 1 M NaOH 溶液。

抽提和硫酸铵分级分离

菜豆种子(我们利用的品种是《莫斯科白绿豆》)在球磨机或者电动咖啡粉碎机磨碎。所得的豆粉(200 克)用 1 升 0.1 M HCl 溶

液在 4℃ 不断地搅拌下进行抽提 24 小时。添加浓 HCl 使抽提物的 pH 保持着在 1.0, 测量抽提物的体积(将近 1200 毫升), 在不断的搅拌下添加等体积的饱和硫酸铵溶液(pH1.0), 把悬浮液在 4℃ 放置 24 小时。稠密的絮状物在这期间沉到底里, 上清悬浮液用虹吸的方法收集, 在 4℃ 54000g 离心 60 分钟。收集透明的上清液, 测量其体积(将近 1400 毫升), 用等体积的饱和硫酸铵溶液(pH 1.0)混和, 所得悬浮液在 -10℃ 下放置 24~48 小时, 然后在 -5℃ 35000g 离心 30 分钟, 上清液弃去, 沉淀悬浮在 2 倍体积的蒸馏水中。

所得到的悬浮液在 4℃ 时对蒸馏水透析, 直到透析液超过 pH 3.9 为止。为了加速透析可在流动的蒸馏水内进行。透析后悬浮液的体积增加 60~70%。悬浮液在 4℃ 40000g 离心 40 分钟。

丙酮分级分离

根据溶液在波长 280nm 的吸收值, 测定离心纯化后的透析液中蛋白质的浓度, 把透析液总蛋白作为 $E_{280}^{1\%} = 10.0$ 计算。通常蛋白质的浓度是 30~32 毫克/毫升。在进行丙酮分级分离以前, 透析液用 0.15M NaCl 稀释到蛋白质浓度为 5 毫克/毫升, 以后添加 1M NaOH 溶液使 pH 达到 5.8。

向所得稀释的透析液在 4℃ 不断搅拌下逐滴的加入冷却到 4℃ 的丙酮, 加的量按 1.4 毫升的丙酮对 5 毫升稀释的透析液计算。加入丙酮后所形成的悬浮液倒到离心管内, 用盖子紧密地盖紧(避免丙酮的挥发), 经过二小时后, 20000g 离心 20 分钟。向透明的上清液加入冷到 4℃ 的丙酮, 加的量按 1.8 毫升丙酮对 5 毫升原始稀释透析液计算。经过 30 分钟, 所得的悬浮液在 4℃ 20000g 离心 20 分钟。沉淀溶于 0.15 M NaCl 溶液中, 然后对蒸

馏水透析和冷冻干燥。从 100 克菜豆中可得 300~400 毫克的 PHA。

用上述方法所得的 PHA 制剂, 在超离心分析时得到一个对称峰, 沉降系数是 6S。在 pH 3.5 和 pH 8.9 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 发现相当于 PHA 的一条主要区带和一条无活性组分(杂质)的染色很弱的区带。引起兔子红血球 (在 0.15 M NaCl 溶液中)凝集的 PHA 最低浓度为: 对 1 毫升洗涤过的 1% 红血球悬浮液来说是 0.2~0.5 微克。在人的外周血液淋巴细胞培养物中可以观察到有丝分裂的 PHA 最低浓度为: 1 毫升培养物 10 微克 PHA。PHA 在 30~50 微克/毫升时可见到最大量的有丝分裂。

冷冻干燥的 PHA 制剂在长时间内(一年或更长)仍保存着自己的活性。溶解状态的 PHA 较易失活: PHA 刺激淋巴细胞的活性经过二星期就消失, 血球凝集活性在几个月后就消失。

PHA 不溶于蒸馏水内, 但是很好的溶解在离子强度为 0.1 的盐溶液内。

测定 PHA 刺激淋巴细胞活性的方法如 Н. Н. Голубева 所述(见 241 页)。

PHA 血球凝集活性的测定

根据 Salk (1944) 的方法测定血球凝集的活性。此法是根据 PHA 能将红血球粘合在一起形成凝集块的能力, 这种凝集块通常用肉眼就能观察到。

红血球的制备 烧杯内盛有 30 毫升 0.15 M NaCl 的肝素溶液(每毫升含肝素 50 单位), 杯中采放 5 毫升兔耳边缘静脉血。红血球用 0.15 M NaCl 溶液洗涤三次, 每次 800g 离心 10 分钟, 用洗涤后的红血球在 0.15 M NaCl 溶液中制备成 2% 的悬浮液(按体积计)。

血球凝集反应的建立 用 0.15 M NaCl 溶液制备二倍稀释的被研究的蛋白质组分(每组分 0.2 或者 0.5 毫升), 向此组分添加等体积的 2% 红血球悬浮液, 试样在 37°C 保温 1 小时, 保温后用肉眼判断凝集作用的滴度, 即引起红血球粘合的所需蛋白质的最低浓度。

测定植物血球凝集素的淋巴细胞刺激活性的方法

Н. Н. Голубева

为了研究植物凝集素(PHA)对淋巴细胞的刺激活性, 可用外周血液淋巴细胞存活期较短的培养物。此法开始是用来研究白血球增多症病人的淋巴细胞(Osgood, Brooke, 1955), 以后用来分析染色体(Hungerford et al., 1959)。近来已证明 PHA 的作用可以引起小淋巴球的胚性转化(Nowell, 1960), 淋巴球培养的方法已广泛用于免疫学, 细胞学和遗传学的研究领域中, 下面所述的方法是从研究的具体目的即测定 PHA 刺激淋巴细胞活性的程度出发而建立的。

选择各种生物的细胞和它们的培养基

最适合的研究材料是健康人的外周淋巴细胞, 因为在培养活细胞时不要求特殊成分的培养基, 并且对已知的诱变剂的反应是稳定的(其中包括 PHA)。也可利用狗的外周血淋巴球。这些细胞对制剂的毒性作用非常敏感, 对刺激素的作用也有足够的敏感性。不宜用兔和鼠的淋巴球进行有丝分裂试验, 因为这些动物的细胞在培养时是很不稳定的, 此外, 对这些细胞进行培养还要求特殊成分的培养基。

从现成的人工合成培养基(No. 199 Parker 培养基), Eagle

培养基和 Eagle MEM 培养基中, 对于悬浮培养物来说最合适的是用改良 Eagle 培养基 (Eagle 1959)。如果缺乏这种培养基, 那么可把淋巴球培养在 Eagle 培养基中, 但是培养瓶应该有象试管那样的凸起的底部。

从外周血提取淋巴球的方法

用这个方法进行工作时应该记住所有溶液、器皿、试管均应消毒灭菌。为防止细菌的污染, 全部工作都要在无菌条件下进行, 不宜采取添加抗菌素的办法。

为了得到淋巴球, 取静脉血 6~8 毫升放到硅烷酮处理过的试管中, 试管壁用稀释至 1/1000 的肝素润湿过, 肝素液的用量是按每 1.0 毫升血 0.1 毫升计算。不应该增加肝素的剂量, 因为它对淋巴细胞有抑制作用。目前肝素应用在临床器官移植学上是作为免疫抑制剂应用的。

盛有肝素血的试管中加入 10% 安瓿装的无菌白明胶, 加入的量是按每 9 毫升血加 1 毫升白明胶计算, 仔细地搅匀, 使白明胶均匀地分布, 将试管成 45° 角放在 37.7°C 恒温器中, 以使红血球更快沉淀; 沉淀的时间应该是 30~60 分钟。红血球沉淀后将带有白细胞有形成分 (占原来体积的 $1/2$ 或 $1/3$) 的血浆柱吸出, 在 900g 下离心 10 分钟, 上清液 (带有白明胶的血浆) 弃去, 向沉淀添加血浆或者第一组血清。添加的体积与倒出上清液体积相同, 将细胞悬浮后用 Горяев 计数板计数单核球和弧形核中性白血球的量。如果在细胞悬浮液内与单核球相比较有 50% 或更多的有粒白血球的话, 那么需要用棉花柱除去有粒白血球。大量的有粒白血球杂质会降低淋巴球的胚性转化作用。

为了准备棉花柱, 用经消毒粉 «Новость» 处理过后又在蒸馏水中洗 2 天的外科棉花, 在恒温箱内把棉花烘干, 撕开纤维, 用它

填满柱。可用巴氏吸量管(末端具有可卸下的细小尖头)作为柱,吸量管宽大部分的直径 6~8 毫米,高 10~12 毫米,可供过滤 1.0~1.5 毫升细胞悬浮液之用。把进行消毒处理过的棉花均匀地填满吸量管,将狭窄的一端作为滤液的接受器放进离心管中,然后以这样的形式进行消毒。细胞悬浮液纯化之前通过在恒温器中温热的柱,让温热的消毒生理溶液流过以使棉花润湿同时也检验柱是否装填均匀,装得正确时溶液应该均一的流出,液滴大小适中。用细胞悬浮液充满柱在 37℃ 恒温箱中放置 12~15 分钟,然后经柱流过 6~7 毫升热的生理溶液。收集滤液,在 900g 下离心 10 分钟。上清液弃去,细胞再悬浮在原始(加到柱上去的)体积的血浆内,同在柱上分离前一样地在 Горяев 计数板内计算它们的量。

培养物的制备和培养时间

计数后将细胞悬液用 Eagle 培养基稀释到最终浓度为每毫升 $5\sim7\times10^5$ 单核球,血浆或者血清的含量应是 15~20%。以这种方式稀释的细胞悬浮液用配尼西林小瓶分装(用 Eagle 培养基悬浮培养时)或具有凸形底部的小瓶(用于一般成分的 Eagle 培养基单层培养时),用橡皮塞紧密的塞住后,在 37.2~37.5℃ 温箱中培养。通常在培养悬浮液分装到小瓶后,立刻添加被研究的 PHA 制剂,并且每一个带有培养物的小瓶添加的体积不应超过 0.2 毫升。

鉴于各细胞的敏感性不同和 PHA 制剂的活性不同,所以最好是在实验开始后经过 48, 72 和 96 小时后取下培养物进行计数。

共同应注意的问题

实验中所应用的培养基和肝素应该预先试验其毒性。Eagle 培养基在 4℃ 中能保存二年,谷氨酰胺必须在实验前添加。所试

验的促细胞分裂剂 (PHA) pH 应为 6.5~7.8。不应随着被研究的促细胞分裂剂(低活力制剂)有高浓度蛋白质带进培养物中, 因为提高蛋白质的百分含量会导致血纤维蛋白膜的脱落 (淋巴球是转移到此膜上去的), 于是在培养基中实际上不再留下用于分析的细胞。

实验结果的形态学统计

取下培养物之前, 将小瓶用力振荡, 将培养物悬液倒入离心管内, 在带有角转头的离心机中于 900g 离心 10 分钟, 以使在离心管壁上能看到沉淀。与沉淀相反方向把上清液倒出, 将细胞再悬浮在 1 滴 1% 柠檬酸钠溶液内, 把每一样品涂到几块载玻片上, 载玻片很快用吹风机吹干, 在甲醇中固定 5~10 分钟。固定的标本用天青与曙红混合颜料染色。为了制备染料须先分开配制天青和曙红溶液, 在每升水内含染料 1 克。溶液在定温下放置 2~4 星期, 然后用五倍水稀释和混合; 制备好的染料其 pH 是 7.4~7.6。混合液中天青与曙红的最适比例是在显微镜检查下实验选择的。

在标本中计数 500 个不同形态的淋巴细胞, 对胚性转化的培养物进行形态分析时, 应该对涂片上最初所见到的各种细胞形态的几百个溶解的不坚固的淋巴球数目进行计数。标出每 100 (或 500) 个淋巴细胞的有丝分裂形态。溶解了的淋巴细胞的百分数将清楚地反映出制剂对淋巴细胞群中某一部分的毒性程度。因为用纯促细胞分裂剂时在未经刺激或者经过刺激的培养物中被溶解淋巴细胞的水平(健康人或者动物)不超过 18~20%。

已转化的淋巴细胞的形态

在促细胞分裂剂-刺激素 (在这里是指 PHA) 的作用下, 小淋巴细胞的培养物转变为在大小与形态上多种多样的细胞。胚细胞

一般地说由于它具有分叶排列的核和液泡化的细胞质，所以也能以大的淋巴球的样子出现。这种大的淋巴球具有中心排列核和宽阔的带有液泡的细胞质外缘。经过刺激的培养物中能见到直径为20~28微米的细胞（小淋巴球直径是5~9微米）。在最大的与最小的细胞之间还有一系列过渡类型，它们的直径都只有12~15微米。但是根据形态，它们不同于小的或者中等的淋巴球。在这些细胞中经常观察到有丝分裂的情形。在评价有丝分裂抑制剂的刺激作用时，应把这些细胞类型列入转化细胞的数目之中。应该指出，用同一个有机体的细胞用同一种刺激剂进行培养时，发现转化水平的误差在5~10%之间。

最后我们将引用植物血球凝集素制剂对健康人淋巴球转化和有丝分裂方面所起作用中的一个例子。这是许多实验中的一个记录。表中记载了各种细胞的形态（见表26），此植物血球凝集素制剂是由Карманский所提供的（И. М. Карманский, 238页）。

表 26 根据植物血球凝集素刺激淋巴细胞活性的实验所得的
形态学统计的记录

实 验 条 件	培养时间 (小时)	小的和中 的淋巴球 (%)	胚 性 转 化			细胞溶解 (%)
			大的淋巴 球(%)	胚胎细胞 (%)	500个细胞中有丝 分裂细胞 数目	
不含植物血球凝集素的 培养物	72	97	2	1	0	18
含有植物血球凝集素的 培养物	72	45	32	23	4	15

注解：1. 为了计算不同细胞形态（小的，中的，大的淋巴球和胚胎细胞）的百分比，统计了培养在植物血球凝集素中500个形态类型。

2. 细胞溶解的百分比是根据最初所见到的100个溶解的细胞计算出来的。

根据羟脯氨酸测定胶原蛋白含量的方法

T. B. Замаараева

胶原蛋白是构成结缔组织细胞间质的胶原纤维的主要组成成分,在组织中胶原蛋白的量,可根据组织和动物的种类以及阻碍胶原代谢的不同的病理过程而起变化。

胶原蛋白主要的特征是它的氨基酸成分中羟脯氨酸占12~14%,这个氨基酸在其他动物组织蛋白质中是没有的。但弹性硬蛋白例外,它含有1~2%羟脯氨酸。因此可以把羟脯氨酸作为一个特殊的标志,根据这一特殊的标志能够发现组织中的胶原蛋白。

方法的原理

现有的测定羟脯氨酸的方法是基于羟脯氨酸氧化形成的产物,其结构类似于吡咯,接着它能与艾氏试剂(对-二甲基氨基苯醛)缩合而生成红色的产物。根据测定方法的具体情况,可利用不同的氧化剂:在 Neumann, Logan (1950)方法中是用过氧化氢作为氧化剂。而在 Stegemann (1958)方法中是用氯胺-T。但用过氧化氢进行氧化作用时,有时不能得到很好重复的结果。下面叙述了用 Bergman Loxley (1961)测定羟脯氨酸的方法,此法是 Stegemann 方法的改良。

试 剂

1. 氧化剂溶液

7%氯胺-T水溶液。保存在室温暗室内,几个星期仍有活性。氯胺-T可用氯胺-B代替。

醋酸-柠檬酸缓冲液 (pH6.0),为了制备此缓冲液,把57克

醋酸钠(三水化合物), 37.5 克柠檬酸三钠(二水化合物), 5.5 克柠檬酸(一水化合物)和 385 毫升异丙醇(化学纯或者重蒸过)一起溶于水内, 再加水至溶液体积为 1 升, 在室温下能长期保存。测定之前氯胺-T 和醋酸-柠檬酸缓冲液以 1:4 比例混合(称为 A 液)。

2. 艾氏试剂

重结晶的对-二甲基氨基苯醛 (Г. Гильман, 1949) 溶解在 57% 高氯酸中, 其比例是 2 克对-二甲基氨基苯醛对 3 毫升高氯酸。溶液贮于棕色瓶中, 在室温下放置三星期内稳定。

异丙醇(化学纯)

测定羟脯氨酸之前, 将 3 体积对-二甲基氨基苯醛溶液和 13 体积异丙醇混和(艾氏试剂)。

3. 羟脯氨酸标准溶液(1 毫克溶于 100 毫升中)用 1mM 盐酸配制有可能防止细菌的感染。此标准溶液在 4°C 可保存几个月。

材料的准备

待测组织制剂的总蛋白质或由组织中抽提出来(中性盐溶液, 酸可溶和酸不溶性胶原蛋白)的胶原蛋白的不同组分, 把它们在安瓿中用 6N 盐酸在 100°C 水解 20~24 小时。如果在水解过程中产生大量的色素物质, 那么应该将样品和少量活性炭一起加热, 过滤, 再用 6N 盐酸洗涤滤器。然后将蛋白质水解液用水浴在瓷蒸发皿中蒸发, 用蒸馏水洗涤二次以除去残留的盐酸。干的残留物溶解在一定体积的水内, 取此溶液 0.2 毫升来测定羟脯氨酸的量。

测定方法

向每管体积为 0.2 毫升待测溶液在搅拌下加入 0.4 毫升异丙醇和 0.2 毫升 A 液, 很好的搅匀, 在室温下放置 4 分钟, 然后向每管添加 2.6 毫升艾氏试剂, 仔细搅匀后在水浴中加热到 60°C, 25

分钟。在试管加热时应该用玻璃球盖住以防止试样体积的减少。接着把试样冷却，在分光光度计 CФ-4 波长为 558 nm 比色杯光径为 1 厘米测定溶液的光密度。以 0.2 毫升蒸馏水代替待测溶液作为空白对照。

溶液的颜色在 30 分钟内不减退。若试样过多颜色强度太深，可用异丙醇进行稀释后再在分光光度计上进行测定。在这种情况下必须根据溶液的稀释倍数进行换算。

分析样品中羟脯氨酸的量可根据标准曲线计算，此曲线是用不同稀释度的羟脯氨酸标准溶液而制作的。

上述测定羟脯氨酸的方法具有很好的重复性和高的灵敏度，可以检出 1 微克的羟脯氨酸，待测溶液中即使有 NaCl 和 HCl 存在也不影响羟脯氨酸测定的准确性，但是 0.1 N NaOH 的存在却会显著的降低颜色的强度。

以 ^{14}C -羟脯氨酸的测定作为模式体系 研究胶原蛋白合成的一个方法

T. B. Замаарева

方法的原理

为了研究在模式体系中胶原蛋白合成的各个阶段，广泛应用同位素的方法。在胶原蛋白组成成分中存在不寻常的氨基酸——羟脯氨酸和羟赖氨酸，而这二种氨基酸在其他蛋白质中是不存在的。此点可以用来鉴定动物组织的其他蛋白质中的胶原蛋白。将组织与碳标记脯氨酸一起保温后， ^{14}C -羟脯氨酸的检出是证明在该体系中胶原蛋白合成最主要的标志。

目前为了研究胶原蛋白多肽链合成的部位，分子转录后的修饰，细胞间胶原蛋白运输等有关问题，利用了胶原蛋白合成的各种

模式体系——组织的存活培养物, 结缔组织细胞培养物, 合成的无细胞系统(见 A. E. Бериян, 第 325 页)。

在离体情况下研究胶原蛋白的合成最方便的方法是用鸡胚软骨组织, 这种组织能活跃地合成胶原蛋白和其他蛋白质。作为研究的材料可利用 17 天鸡胚顶骨软骨组织或者生长 10~11 天鸡胚胫骨。

下面叙述了用鸡胚软骨组织研究的方法和根据 Juva 和 Prockop (1966) 测定 ^{14}C -羟脯氨酸的方法。

试 剂

Krebs A 培养基 (用 mM 含量表示): Na_2HPO_4 15.7; KH_2PO_4 1.6; NaCl 111.2; KCl 5.4; MgCl_2 1.3; NaHCO_3 4.0; 葡萄糖 13.0 (Krebs, 1950)。

6N HCl 溶液和浓 HCl。

^{14}C -脯氨酸 (100 微居里/mM)。

在 118~124°C 蒸馏过的甲基溶剂剂*。

闪烁溶液 (Prockop, Ebert, 1963): 15 克 2,5-联苯噁唑 (PPO), 50 毫克联苯噁唑苯 (POPOP) 和 1 升闪烁苯, 保存在棕色瓶中放于冰箱。

脯氨酸和羟脯氨酸。

1N NaOH 溶液。

1% 酚酞溶液 (溶于 96% 乙醇中)。

0.2 M 焦磷酸钠溶液 (pH 8.0); 添加浓 HCl 使 pH 8.0。

0.2 M 氯胺-T 溶液 (新蒸馏出)。

3.6 M 硫代硫酸钠溶液 (室温下在苯液层覆盖中能保存 1 月)。

1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)。

* 是一种溶剂, 有效成分为甲氧乙醇——译者注。

闪烁苯。

将硅胶在球磨机中磨碎 4~5 小时(~100 毫升体积), 放入量筒中, 加乙醇到 2 升, 悬浮 5 分钟, 然后把上清液倒入第二个量筒中, 悬浮物放置 30 分钟。上清液倾出, 而沉淀重新悬浮在 2 升乙醇中, 放置 30 分钟, 用乙醚重复此操作。沉淀先在空气中干燥, 然后在 100°C 干燥一昼夜。硅胶保存于有紧密磨口塞的瓶内。

艾氏试剂 (Prockop, Udenfriend, 1960)。27.4 毫升浓硫酸加到 200 毫升无水乙醇中, 把此混合液冷却。在另一个烧杯中放 120 克对-二甲基氨基苯醛(从无水乙醇中二次重蒸馏), 加入 200 毫升无水乙醇, 然后在搅拌下慢慢加入酸化乙醇到苯醛溶液中。艾氏试剂在冷处保存。可保存几星期仍能用。

经过分部蒸馏纯化的吡咯。新蒸馏的吡咯标准溶液(0.1 μ M/毫升)在 -20°C 的苯中可保存几个月。

用软骨组织实验

10~11 天鸡胚的整个胫骨放在少量的 Kribs 培养基中, 在双筒放大镜下分离和剥净周围的软组织。分离后的骨头放到含有 Kribs 培养基的圆底烧瓶中, 圆底烧瓶放在冰浴中。如必须进行对照实验时, 即利用一小块胚胎骨头作为对照试验, 另一块作为试验样品, 每一试样含有二块或更多的骨头。组织在振荡情况下于 3 毫升 Kribs 的培养基中 37°C 预先保温 1 小时, 然后添加 4~8 微居里 ^{14}C -脯氨酸继续保温 1~2 小时。

保温结束后组织在少量(约 5 毫升)蒸馏水中匀浆, 将匀浆对流动的自来水透析过夜, 再对蒸馏水透析 4 小时, 蛋白质的水解是用 6 N HCl 100°C 在玻璃安瓿中进行 20~24 小时。水解完毕后试样用活性炭处理除去色素物质, 用滤纸过滤和用 6 N HCl 溶液洗涤滤纸。滤液在水浴上蒸发, 蒸发过程中用蒸馏水洗涤二次, 干

的残留物溶于3毫升水中。取此溶液0.1毫升用来测定蛋白质总的放射性, 2.5毫升用来测定 ^{14}C -羟脯氨酸。水溶液放射活性的测定是在含有0.1毫升待测溶液, 3毫升甲基溶纤剂和5毫升闪烁液(Prockop, Ebert, 1963)体系内进行。试样放射性是在闪烁计数器中测量。

^{14}C -羟脯氨酸的测定

此法的原理是用氯胺-T氧化 ^{14}C -羟脯氨酸, 然后分离氧化放射性产物——吡咯和 ^{14}C -脯氨酸, 其方法是用甲苯的提取和在硅胶柱上加以分离。

在50毫升具有磨口塞的试管内进行反应。向2.5毫升待测液加入载体——2.5毫克羟脯氨酸和脯氨酸; 用1N NaOH溶液调pH至8.0, 然后向试样加6毫升0.2M焦磷酸钠溶液(pH8.0)和1.4毫升新蒸馏出的0.2M氯胺-T溶液, 把混合液在室温下搅拌20分钟, 用氯胺使羟脯氨酸进行氧化反应, 加入6毫升3.6M硫代硫酸钠停止反应。用1N NaOH溶液把试样pH调到8.0(用酚酞作指示剂), 向试样加入4毫升1M Tris-HCl缓冲液(pH8.0)、过量的固体NaCl和10毫升闪烁甲苯。试样强烈的振荡3分钟, 使试样分成甲苯相和水相, 在甲苯相中含有放射性的脯氨酸, 用与水泵相连的巴氏吸管小心吸出。剩下来的水相含有 ^{14}C -羟脯氨酸的氧化放射性产物, 在水浴上加热25分钟, 为的是使羟脯氨酸的氧化中间产物转化成吡咯, 冷却后向试样加入过量的固体NaCl和12毫升甲苯, 混合液象第一次一样振荡。分相后从甲苯层(含有放射性吡咯)取出10毫升, 加到硅胶柱内。所有下面全部操作都应避免水进入到试样。装有玻璃滤器柱的底部(柱: 12×160毫米)应先垫二层特殊纯化过的细砂, 在甲苯中放入6毫升硅胶悬浮液, 按3克硅胶对10毫升甲苯计算。10毫升放射性溶

液通过柱后,先用 5 毫升甲苯洗涤,然后用 10 毫升甲苯洗涤。从所得 25 毫升洗脱液中,取 10 毫升与 0.5 毫升闪烁溶液混和,在闪烁计数器中测定吡咯的放射性。

为了测定全部待测蛋白质水解液中羟脯氨酸的放射性,应考虑到试样稀释的倍数,羟脯氨酸氧化的放射性产物分离过程中的损失和计数器的效率(E),将计数器读数按下式加以校正:

$$a = X \times \frac{100}{E} \times \frac{25}{10} \times \frac{12}{10} \times \frac{3}{2.5} \times \frac{5}{4} \times \frac{100}{P} \times \frac{1}{60}$$

公式中 a——所有待测试样中¹⁴C-羟脯氨酸的绝对放射性(每秒钟衰变值) X——计数器上读数(脉冲/分); 25/10——为了测量放射性所取洗脱液的体积的校正数; 12/10——从第二次甲苯抽提液中体积的校正数; 3/2.5——为了测定所取水解液体积的校正数; 5/4——¹⁴C-羟脯氨酸转变成¹⁴C-脯氨酸时羧基碳损失的校正数; P——根据颜色反应所检出的以吡咯形式检出的羟脯氨酸%数。

为了计算在羟脯氨酸测定过程中羟脯氨酸——载体损失的程
度,也就是以吡咯形式出现的羟脯氨酸的百分比,应用艾氏试剂进行了光电比色测定。0.1 毫升洗脱液用甲苯稀释到 5 毫升,迅速地与 2 毫升艾氏试剂混匀,在暗室内室温放置 30 分钟呈现出颜色。在波长 560 nm 下以空白管为对照(含有 5 毫升甲苯和 2 毫升艾氏试剂)测其光密度。

与待测试样同时取含有 0.02 和 0.04μM 吡咯的 2 个标准溶液进行颜色反应。

以吡咯形式出现的羟脯氨酸百分比(P)可根据光电比色测定的结果,用下列公式计算:

$$P = \frac{D}{D_{ss}} \times C \times \frac{25}{0.1} \times \frac{1}{K} \times 100$$

式中 D——分析样品中吡咯的光密度; D_{ss}——吡咯标准溶液的光

密度; C——在标准品中吡咯的 μM 数(一般 $0.04 \mu M$); $25/0.1$ ——光电比色测定所取洗脱液体积的校正数; K——羟脯氨酸——载体的量, 以 μM 表示(这里是 $15.2 \mu M$)。

在同一天中测定成分相同的一组试样时, 检出率的变化不会大于 ± 3 。在少于 50 毫克氨基酸含量的试样中检出率(P)是 45~65。在蛋白质含量很大时这个值显著的下降, 其原因是由氧化物和氯胺-T 之间的比值破坏之故。除此之外, 所研究的试样不应该含有大于 $0.5 \mu M$ 羟脯氨酸, 因为大量的羟脯氨酸会使由 $15.2 \mu M$ 羟脯氨酸作为载体测定吡咯的结果大大失真。

本法能使放射性的脯氨酸和吡咯很好的分离。所研究试样含有 80000 脉冲/分 ^{14}C -脯氨酸, 在甲苯抽提液中放射性不应高于本底的活性。

胶原蛋白脯氨酸-羟化酶活力的测定

T. B. Замаева

由于胶原蛋白 α -链的脯氨酸残基的羟化作用而生成羟脯氨酸的反应是一个酶促反应。此反应由胶原蛋白脯氨酸-羟化酶所催化(CE 1.14, 11.2, 脯氨酸:2-羟戊二酸二加氧酶)。这个酶广泛的分布在许多动物组织中, 它的活性随着组织种类和动物品种, 年龄和生理状态而变化, 脯氨酸-羟化酶活力的增加已在结缔组织增生的不同病理过程中发现。例如: 在实验性矽肺病 (Halme et al., 1970), 动脉粥样硬化症 (Fuller, Langner, 1970), 胶原病 (Hannuksela et al., 1970), 肝脏纤维化 (Takeuchi, 1967) 等等。因此可把这个酶的活性作为组织的胶原蛋白合成系统的某种指标。

方法的原理

测定胶原蛋白的脯氨酸羟化酶活力根据所用底物的性质不同而采用不同的方法，在模式羟化系统内用来作为底物的是各种人工合成的肽，它们的结构与胶原蛋白相似。应用人工合成的多肽（脯-脯-甘），酶活性的测定是根据羟脯氨酸量的增加（Hutton et al., 1968），它的增加量可用颜色反应来进行测定。

但是测定脯氨酸羟化酶活力最常用的是利用放射性本胶原（不被羟化的胶原蛋白前体）作为底物。胶原蛋白脯氨酸残基羟化作用的酶促反应是在有氧参与下进行的，并要求有一系列辅助因子存在： α -酮戊二酸盐， Fe^{2+} 和抗坏血酸。因此在羟基化反应阻断的条件下（缺氧或者 α ， α' -联吡啶与铁离子结合）在细胞内合成不含羟脯氨酸而含有大量脯氨酸的胶原蛋白前体。

如果在有 ^3H -脯氨酸参与下合成的前体，那么它与酶保温后 ^3H -本胶原的羟化程度，可根据在反应混合物中可被蒸馏出来的 $^3\text{H}_2\text{O}$ 的形成而测定（Hutton et al., 1966）。可利用 ^{14}C 本胶原所生成的 ^{14}C -羟脯氨酸来测定酶活力（见 T. B. Замаарева, 见 248 页）。

下面叙述部分纯化胶原蛋白的脯氨酸-羟化酶的分离和 ^{14}C -本胶原的制备和模式羟基化作用系统的组成。

仪器和试剂

带有聚四氟乙烯杵的玻璃匀浆器。冷冻离心机，12000~40000 转/分。装有振荡器（用于振荡试样）的 37°C 水浴。闪烁计数器。

Kribs 培养基（见 T. B. Замаарева, 248 页）； α ， α' -联吡啶。浓 HCl 和 6 N HCl 溶液。 ^{14}C -脯氨酸；100 毫居里/mM； FeSO_4 。 α -酮戊二酸盐；Tris；2-巯基乙醇；过氧化氢酶；清蛋白；甘氨酸；硫酸

铵。测定 ^{14}C -羟脯氨酸的试剂(见 T. B. Замаева, 248 页)。

制备 ^{14}C -胶原蛋白原

从 10~11 日龄的 10 只鸡胚软骨组织(大的胫骨, 股骨和髌骨)放在少量 Kribs 培养液中, 并置于冰浴中除去周围的软骨。把分离的软组织放于 5 毫升含有 $1\text{ mM } \alpha, \alpha'$ -联吡啶的 Kribs 溶液中, 在搅拌下 37°C 培养 30 分钟, 然后添加 30 微居里 ^{14}C -脯氨酸, 继续保温 2 小时。保温后组织在蒸馏水中用带有聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器中匀浆, 匀浆液对流动自来水透析过夜, 然后对蒸馏水透析 2~3 小时, 匀浆液进一步在 100000 g 下离心 1 小时, 含有 ^{14}C -本胶原的上清液在 90°C 加热 10 分钟, 用来作为测定胶原蛋白的脯氨酸羟化酶的底物。少量的本胶原溶液可在 -20°C 冷冻保存。底物的放射活性是在含有 0.1 毫升待测溶液, 3 毫升甲基溶纤剂和 5 毫升闪烁液的体系内, 在闪烁计数器上读数。

提取部分纯化的胶原蛋白脯氨酸羟化酶制剂

胶原蛋白脯氨酸-羟化酶制剂按 Halme 等的方法从 12 天的鸡胚中提取(Halme et al., 1970b)。30~50 只鸡胚截下头后, 进行洗涤, 在 2.5 倍体积 0.01 M KCl 溶液中用具有聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器进行匀浆, 所得的匀浆在 15000 g 离心 30 分钟。小心的吸出上清液, 在细心的搅拌下向它添加少量硫酸铵直到 0.3 饱和度(每 1 升溶液 162 克硫酸铵)。所产生的沉淀离心分离弃去, 向上清液添加硫酸铵到 0.65 饱和度(根据计算每一升溶液再加 216 克硫酸铵)。在 0.3~0.65 硫酸铵饱和度情况下所析出的沉淀蛋白质组分, 溶于含有 0.1 M KCl 和 0.1 M 甘氨酸的 0.01 M Tris-HCl 缓冲液中($\text{pH}7.8$), 对此缓冲液进行透析, 二次更换此缓冲液, 透析时间为 16~20 小时, 所有操作均在 4°C 进行。按

Lowry 方法测定蛋白质浓度(Lowry et al., 1951)。

¹⁴C-本胶原的羟化作用体系

¹⁴C-本胶原的脯氨酸残基进行羟基化反应是在含有以下组成成分的体系内进行的(试样总的体积 4 毫升): 40000~50000 脉冲/分*¹⁴C-本胶原, 5 毫克部分纯化的胶原蛋白的脯氨酸-羟化酶制剂, 0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5) 0.08 mM FeSO₄, 0.5m M α -酮戊二酸盐, 2mM 抗坏血酸, 0.1mM 2-巯基乙醇, 0.4 毫克过氧化氢酶和 2 毫克经过 90°C 预热 10 分钟的清蛋白(Halme et al., 1970)。试样在搅拌情况下 37°C 保温 1 小时。添加等体积浓 HCl 停止反应。

蛋白质用 6N HCl 在玻璃安瓿中 100°C 水解 20~24 小时, 进一步蒸发水解液, 蒸发时用蒸馏水洗涤几次, 干的残留物溶解在 3 毫升蒸馏水中。取这溶液 0.1 毫升用来测定蛋白质的总放射性, 取这溶液 2.5 毫升来测定 ¹⁴C-羟脯氨酸(见 T. B. Замаарева, 248 页)。关于 ¹⁴C-本胶原脯氨酸残基酶促羟化作用的程度, 可根据所生成的放射性羟脯氨酸对总的放射性底物的比值来判断, 底物总的放射性以百分数来表示。

从细菌胶原蛋白酶除去其他蛋白质

水解酶杂质的方法

A. E. Берман, T. A. Оборотова

为了研究胶原蛋白的生物合成和一级结构, 目前广泛的应用

* 根据 SI 体系同位素或者制剂的放射性应以每秒钟衰变来表示。但在不能计算计数器的效率时, 就不能这样做。

某些细菌所合成的蛋白质水解酶类——胶原蛋白酶，它只能分解胶原蛋白，对其他蛋白质没有活性。市售的不同类型的胶原蛋白酶制剂，往往含有其他蛋白质水解酶的杂质，利用胶原蛋白酶来研究胶原蛋白时必须除去其他蛋白水解酶杂质。下述的方法(Peterkofsky, Diegelman, 1977)是用 Sephadex G-200 凝胶过滤纯化某些市售的胶原蛋白酶制剂，本法具有简便和高效率的特点。从胶原蛋白酶制剂中除去其他蛋白水解酶杂质的程度是依据分解非胶原蛋白酶性质的放射性蛋白质底物来判断的。

制剂和溶液

第一放射性制剂——冷冻干燥的带放射性的中性-可溶性胶原蛋白，它的比放射性强度为 10000~20000 脉冲/分/毫克。给大鼠注射标记的甘氨酸或者脯氨酸经过一昼夜后，从鼠的皮肤中分离放射性胶原蛋白。其方法如文献中所述的 (Kivirikko, Prockop, 1967)。可利用放射性胶原富集的蛋白制剂，它是从鸡胚骨与同位素标记的脯氨酸一起保温后提取出来的 (见 T. B. Замаева, 253 页)。

第二放射性制剂——冷冻干燥的放射性蛋白制剂，它不含放射性胶原蛋白，如果利用放射性色氨酸作为同位素标记的前体，肯定能够得到不含放射性胶原蛋白的制剂，因为胶原蛋白分子不含有这种氨基酸。我们利用的制剂是从鸡胚骨头与同位素标记的色氨酸保温后所提取而得的。

含有 1 mM CaCl_2 的 0.05 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) (Tris-Ca 缓冲液)。

Sephadex G-200 凝胶，事先用 Tris-Ca 缓冲液平衡。

0.1% 清蛋白水溶液。

50% 和 5% 三氯醋酸水溶液(TCA)。

5 克 PPO 和 50 毫克 POPOP 溶于 1 升闪烁甲苯中 (甲苯闪烁体)。

分析的步骤

50~100 毫克胶原蛋白制剂溶解在 2 毫升 Tris-Ca 缓冲液中,使不溶性颗粒离心沉淀。吸出上清液加到 Sephadex G-200 柱上(柱高 120 厘米,直径 2 厘米),Sephadex G-200 柱事先用 Tris-Ca 缓冲液平衡与洗涤,用同一缓冲液洗脱,流速是 6~7 毫升/小时,用自动部分收集器收集,每 3 毫升为一组分。洗脱完毕后(柱的总体积是 300 毫升左右),每一组分在波长 280 nm 测其光密度。为了测定所得到的组分中胶原蛋白酶和非胶原蛋白酶的活性,用 Tris-Ca 缓冲液制备了二种放射性的制剂,即有放射性胶原蛋白的制剂(第一放射性制剂)和无放射性胶原蛋白的制剂(第二放射性制剂),二种制剂在按 1 毫升溶液含有 1000~1500 脉冲/分计算。向 1 毫升底物溶液加入 0.05 毫升所收集的组分溶液,对每一组分平行的做四个试验——每个底物做 2 个。除此之外,对每一底物平行的做三个空白对照试验,此对照试验中添加 0.05 毫升 Tris-Ca 缓冲液。空白对照和实验试样在 37°C 保温 90 分钟,保温后试样在冰浴中冷却,向每一试样中加 0.2 毫升清蛋白溶液(用作载体)和 0.1 毫升 50% TCA 溶液,搅匀试样,放置到沉淀析出。沉淀收集到微孔过滤膜上,用 5% TCA 洗涤,再用乙醇洗涤,滤膜放置于含有甲苯闪烁体的小瓶中并用闪烁计数器测量其放射性。组分的水解蛋白酶活性是依据放射性底物的分解来进行测定,可根据下式计算分解的百分比:

$$\text{水解}\% = 100 \frac{T \times 100}{C}$$

式中 T ——实验试样放射性平均值; C ——空白对照平均值。

图 28 是《Ferak》公司出售的胶原蛋白酶制剂的凝胶过滤层析谱的一个例子，作为放射性胶原蛋白酶的底物是利用鸡胚骨头与 ^{14}C -脯氨酸保温后制备而得的蛋白质制剂。而放射性非胶原蛋白酶的底物是从鸡胚骨头与 ^{14}C -色氨酸一起保温后提取的。如图 28 所示在 54~65 收集组分中具有很高胶原蛋白酶活性，它们能分解用脯氨酸标记的蛋白质的 50~60%。在这材料中放射性胶原蛋白的总含量与文献资料是相符的。上述这些组分完全不分解从同一来源提取出来的用 ^{14}C -色氨酸标记的放射性蛋白质。

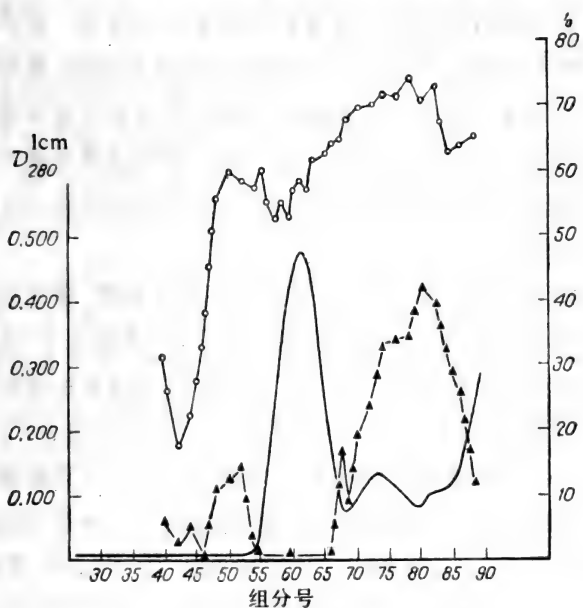


图 28 胶原蛋白酶制剂(《Ferak》公司)在Sephadex G-200 凝胶过滤使胶原蛋白酶和其他蛋白酶分离的洗脱图谱。蛋白质含量曲线(实线); ^{14}C -胶原蛋白分离曲线(小圆圈); ^{14}C -非胶原蛋白分离曲线(三角形), 纵座标——在波长 280 nm 下的光密度单位来表示的蛋白质含量和放射性底物的分解百分比; 横座标——洗脱收集组分

第三部分

研究动物细胞蛋白质合成系统的方法

多肽链合成时间的测定方法

В. Л. Лейтин, М. И. Лерман

近几年来蛋白质生物合成方面的理论研究指出, 翻译过程可用动力学参数来加以描述, 这些参数包括肽链的起译, 延伸和肽链的终止的时间或者速度。这些参数是测定蛋白质合成系统的主要参数, 而在翻译水平上蛋白质生物合成的调节是通过动力学参数的变化来实现的。有时也用起译时间和肽链合成时间(t_s)来描述翻译过程的特征。

将蛋白质合成系统下列这些特性的变化(例如: 蛋白质合成的绝对速度, 多聚核糖体的外形, 核糖体沿 mRNA 的分布, 生长着和已合成的多肽链的动力学) 与计算机模拟翻译过程所得的结果加以比较时, 能够得到关于动力学参数变化定性的信息。对于细菌细胞, 真核细胞培养物和无细胞系统来说又研制出了直接测量延伸和终止以及 t_s 的时间的方法, 对于动物体内实验来说只报导了测定 t_s 的方法(В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975 a, б; Mathews, et. al., 1973), 测量起译时间的方法原理至今仍没有解决。

在动物实验中测定 t_s 的一般原理和特点

下面所采用的缩写: t_s ——多肽链合成的时间(延伸和终止时间的总和), 也就是从起译复合物与起始氨基酰-tRNA 相结合的瞬间开始, 直到在肽链的 C 端加上最后一个氨基酸后, 多肽链从多

聚核糖体复合物上除去为止所经过的时间; t_L ——多肽标记的时间, 也就是标记氨基酸被多聚核糖体利用的时间; t_{LA} ——动物标记的时间, 也就是动物和标记氨基酸保温的时间; DR_{rp} ——伸长中的多肽的放射性剂量, 也就是伸长中多肽的放射性与伸长着和已合成及多肽的总放射性的比例。

t_s 的测量是基于标记的氨基酸掺入到伸长着的和已合成的多肽上去的研究完成的。方法的选择主要决定于细胞内标记氨基酸的储存库的比放射性的变化特征和准确测定 t_L 的可能性。同样存在某些局部的限制: 一些方法要求在非静止期进行标记动力学的研究($t_L \leq t_s$), 另些方法要求了解多肽中全部氨基酸排列的序列以及其末端碎片或者末端氨基酸。

在动物实验中测定 t_s 与在细菌细胞、真核细胞培养物和无细胞体系中测定这个参数的相比, 较会遇到以下复杂的情况。在给动物注射标记氨基酸时: 1) 氨基酸储存库的比放射性强度不恒定; 2) 放射性前体掺入量常发生很大的变动; 3) t_L 本质上不同于 t_{LA} , 因为在标记物进入细胞内部氨基酸储存库和除去所研究的器官后, 使蛋白质合成中断, 这些过程中要化费一部分时间。除此之外, 在标记过程的恒态阶段($t_L \geq t_s$) 研究肽链合成动力学是较方便的, 虽然这条件不是一定的。

公式及其应用的条件

DR_{rp} ——是根据伸长着的和已合成的多肽的放射性数据提出的, 它不依赖氨基酸库比放射性强度和标记物掺入的实验性偏差, 理论上(Haschemeyer, 1969; Brunschede, Bremer, 1971) t_s 是可以在给出 t_L 值时测定 DR_{rp} 的值而计算出来的。

$$DR_{rp} = \frac{t_s}{2t_L} \quad \text{在 } t_L \geq t_s \text{ 时,} \quad (1)$$

或可通过研究伸长中和已合成的多肽的标记动力学而测量 DR_{rp} :

$$\frac{1}{DR_{rp}} = \frac{2}{t_s} t_L \quad t_L \geq t_s \quad (2)$$

在后一种情况下可根据图表中直线的斜率 $\frac{1}{DR_{rp}}$ 对 t_L 的关系来测定 t_s 值。

在动物实验中 $t_L = t_{LA} + t_{ssp} - t_{LAG}$, 此方程式中 t_{LA} ——从给动物注射标记氨基酸时起到被研究器官开始冷却时止所经过的时间; t_{ssp} ——从开始冷却到蛋白质合成完全停止所经过的时间; t_{LAG} ——从注射标记氨基酸起到它进入细胞内储存库所经过的时间。 t_{LA} 间接测定的, 但是实验测定 t_{ssp} 和 t_{LAG} 带有很大技术性的困难。因此在 t_{LA} 不变时根据公式(1)不能计算 t_s 值, 但是由于 t_{ssp} 和 t_{LAG} 是只与实验条件有关的常数, 所以可以将公式(2)改写成便于实验中应用的形式(В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975 а, б):

$$\frac{1}{DR_{rp}} = C_L + \frac{2}{t_s} \cdot t_{LA} \quad \text{在 } t_{LA} \geq t_s - \Delta t \quad (3)$$

这里 $C_L = \frac{2(t_{ssp} - t_{LAG})}{t_s} = \frac{2\Delta t}{t_s}$ 是常数, t_s ——是由 $\frac{1}{DR_{rp}}(t_{LA})$

(直线的斜率)计算而得, 与 Δt 无关。

由公式(3)测定 t_s 的实验可按以下程序进行: 给动物注射标记氨基酸, 经过不同间隔时间后把它杀死, 测量待测器官的细胞内的 DR_{rp} 值。上述方法可以利用来测定正常和病理状态下的 t_s , 也可以测定在实验影响下改变多肽链合成的速度。后一种情况下所指的应该在标记氨基酸注射之前采用。

在研究快速作用物的影响时, 可以设计另一个实验来测定多肽链合成的时间。在正常条件下标记后, 在静止期给动物注射可以改变合成的初速度的作用物和研究函数 $\frac{1}{DR_{rp}}(t_{LA})$; t_s 可根

据直线的斜率 $\frac{1}{DR_{rp}}(t_{LA})$ 计算 (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975 6):

$$\frac{1}{DR_{rp}} = C_2 + \frac{2}{t_s} \cdot t_{LA} \quad \text{在 } t_{LA} \geq t_L^0 + t'_{LAG} - \Delta t \quad (4)$$

式中 $C_2 = 2(t_L^0 + t'_{LAG}) \left(\frac{1}{t_s^0} - \frac{1}{t_s} \right) - \frac{2\Delta t}{t_s}$

是依赖于实验条件的常数; t_s^0 和 t_s ——在正常条件下和可改变合成最初速度的作用物作用下多肽链合成的相应时间; t_L^0 ——注射作用物的时间; t_{LAG} ——从注射作用物到它开始起作用时所经过的时间; $\Delta t = t_{ssp} - t_{LAG}$ 。当标记的多肽绝大部分不是在细胞质多聚核糖体上合成时, 当蛋白质合成的绝对速度受到强烈抑制时, 这个方法不同于过去的方法, 能合理地用来测量 t_s 值 (В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1975)。

在某些情况下为了测量 t_s 的相对变化, 不必要研究伸长中的和已合成的多肽标记的动力学。由公式 (1) 可得出蛋白质合成系统的二种不同状态:

$$\frac{DR_{rp}}{DR_{rp}^0} = \frac{t_s}{t_s^0} \text{ 在 } t_{LA} \begin{cases} \geq t_s - \Delta t \\ \geq t_s^0 - \Delta t \end{cases} \quad (5)$$

在这类实验中, 在正常条件或者任意选择的 t_{LA} 间隔时间给予某种作用后给平行的二组动物注入标记物, 和测量伸长中多肽的放射性剂量。

$$t_{LA} \begin{cases} \geq t_s - \Delta t \\ \geq t_s^0 - \Delta t \end{cases}$$

应用这个方法时要谨慎, 因为它不可能控制在细胞质多聚核糖体上多肽链合成的动力学。但是, 毫无疑问它能应用于生理条件变化的情况下。

下面将叙述关于在正常条件下和在有翻译抑制剂（放线菌酮和金精三（羧）酸作用下作小白鼠体内实验时测定 t_s 的实验。

试剂和动物

注射试剂：放线菌酮、金精三（羧）酸和均匀标记的 $L-^{14}C$ -亮氨酸（0.915 毫居里/毫克）和 $L-3-^{14}C$ -苯丙氨酸（1.37 毫居里/毫克）一起溶于 0.14 M NaCl 溶液内，使其浓度达到每 0.5 毫升中有一定的剂量（放线菌酮 0.05~5.0 毫克，金精三（羧）酸 2.5~25.0 毫克， ^{14}C -氨基酸 10~30 微居里）。

匀浆用溶液：0.25 M 蔗糖，5mM $MgCl_2$ ，50mM KCl，25mM Tris-HCl，pH 7.6（25°C）。

制备蔗糖密度梯度溶液：具有一定克分子浓度的蔗糖，5mM $MgCl_2$ ，50mM KCl，0.01% 聚乙烯硫酸酯，25mM Tris-HCl，pH 7.6（25°C）。

闪烁体：3.5 克 PPO 和 0.1 克 POPOP 溶于 1 升甲苯中。

动物的准备，小白鼠（品系 BaLb/c），体重 23~27 克；试验前 16~24 小时不给以食物。

标记条件

以 3~5 只小鼠为一组，每组腹腔注射溶液的总体积为 0.5 毫升，以小白鼠平均体重 25 克计算剂量。为了根据公式 (3) 来测定 t_s ，给小白鼠注射 0.14M NaCl 溶液或者放线菌酮（0.5 毫克），经过 20 分钟后注射 ^{14}C -亮氨酸溶液（30 微居里），经过 2~15 分钟后杀死动物。为了根据公式 (4) 来测定 t_s ，给动物注射 ^{14}C -亮氨酸（30 微居里），经过 2 分钟后注射放线菌酮（5 毫克）注射后 2~13 分钟杀死动物。为了根据公式 (5) 来测定 t_s 相对的变化，给小白鼠注射 0.14M NaCl 溶液或者金精三（羧）酸（2.5~25 毫克），经过 45

分钟后注射 ^{14}C -苯丙氨酸 (20 微居里) 溶液, 注射后 5 分钟杀死动物。

取出肝脏, 停止蛋白质合成和测定 t_{LA}

将小白鼠杀死后取出肝脏, 将它在液氮中冰冻(动力学实验)或者将它放到匀浆用的已冷却的溶液中(固定 t_{LA} 的实验)。在某些实验中把冰冻的肝脏保存在 -20°C 12~20 小时, t_{LA} 值是由给动物注射标记氨基酸时起到肝脏开始冷却时止的时间间隔决定的。 t_{LA} 的下限不超过取出肝脏所需的时间(~ 30 秒钟), 上限(15~20 分钟)不超过肝脏内重新合成的清蛋白开始分泌到血液中所需的时间。

组织的匀浆, 除去线粒体后的上清液用

蔗糖密度梯度制备和分级分离

全部操作在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 进行, 肝脏洗涤后用小剪刀剪碎, 在聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器中匀浆(匀浆时组织重量(克)对缓冲液体积(毫升)的比例是 1:3, 匀浆研杵的往返次数是 10 次)。匀浆液通过 2~3 层消毒过的纱布过滤, 15000g 离心 15 分钟(超离心机, Spinco Beckman L-2.50, 转头型号 50T 或者 12000 转/分 3°C)。弃去沉淀, 所得上清液(除去线粒体后的上清液或者 S_{15})通过四层消毒纱布过滤, 添加 0.1% 聚乙烯硫酸酯(最终浓度 0.01%)和 13% 脱氧胆酸钠(最终浓度为 1.3%), 保温 10 分钟后, 铺于蔗糖浓度梯度上, S_{15} 用二种方法分级分离: 1) 分段-线形梯度(5 毫升 2.3M 蔗糖 + 45 毫升 0.3~1.8M 蔗糖 + 2 毫升 S_{15}), 68000g 离心(SW25.2 转头, 19000 转/分) 3°C 12 小时; 2) 分段-线形梯度(1 毫升 2.6M 蔗糖 + 3 毫升 0.5~1.0M 蔗糖 + 1 毫升 S_{15}), 200000g 离心(转头 50T, 47000 转/分) 3°C 90 分钟。

伸长中的和已合成的多肽中放射性的测量

离心以后将蔗糖密度梯度的离心管中的内含物逐滴进行分级分离,测定每一组分的 260 nm 光密度,得到紫外光吸收图谱,向沉淀系数 $>20\text{ S}$ 的梯度组分中分别加入 0.1 毫升经过胆酸钠处理过的未标记的 S_{15} ,然后添加 1 M NaOH 溶液到最终浓度为 0.1 M ,使氨基酰-tRNA 水解,在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保温 10 分钟后添加等体积 10% TCA。20~60 分钟后 ($0\sim 4^{\circ}\text{C}$) 用硝基纤维素膜过滤沉淀物,在甲苯- PPO - POPOP 系统内用液体闪烁计数器 (Nucler Chicago Mark II) 测其放射性。计算核糖体和多聚核糖体 ($>60\text{ S}$) 沉降区带中标记物的总和,即可测定伸长中的多肽的放射性;计算核糖体亚基沉降区带和蔗糖梯度上层 ($0\sim 60\text{ S}$) 中标记物的总和,即可测定已合成的多肽的放射性; DR_{rp} 是根据伸长中的多肽的放射性对伸长中和已合成的多肽的总放射性比值来计算。使用该技术保证在梯度内标记物回收率达到 100% (全部组分总放射性对进入梯度中放射性的比)。

图表的绘制,数据的数学处理和 t_s 的计算

在座标中所列的动力学数据: $\frac{1}{\text{DR}_{\text{rp}}}$, t_{LA} 与公式(3) (图 29, a) 和公式(4)中的相同(图 29, b)。对结果用最小二乘方加以处理后可画出直线 $\frac{1}{\text{DR}_{\text{rp}}}-(t_{\text{LA}})$ 。 t_s 是从相应的直线斜率计算而得: 在正常条件下 t_s 等于 1.45 分钟(见图 29, a, 直线 1), 给动物注射放线菌酮,其剂量为 0.5 毫克时, t_s 增加到 3.9 分钟(见图 29, a, 直线 2), 当剂量增加 5 毫克时, t_s 增加到 350 分钟(见图 29, b)。金精三(羧)酸 ($2.5\sim 25.0$ 毫克) 引起 t_s 线形的增加总共为 2.5 倍(根据公式(5)计算, 图 30)。

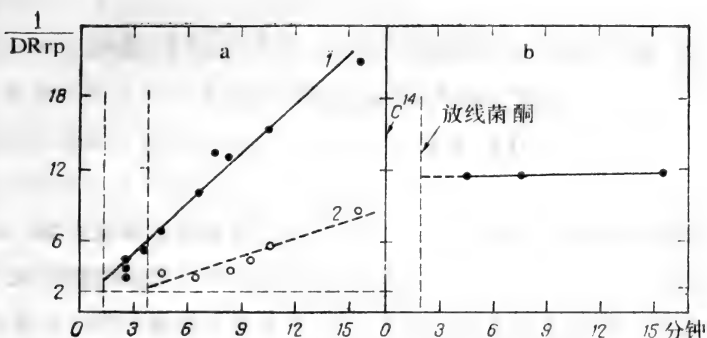


图 29 在正常条件下和在放线菌酮作用下多肽链«平均»合成时间的测定
给小白鼠注射 0.14 M NaCl (0.5 毫克/25 克体重) (a, 1) 或者放线菌酮
(0.5 毫克/25 克体重) (a, 2) 和 (5 毫克/25 克体重) (b); 研究小白鼠肝脏细
胞伸长中的多肽和已合成的多肽的标记动力学。t_s 的测定按公式 (3)—a
或者根据公式 (4)—b。纵座标——伸长中的多肽的放射性部分的倒数;
横座标——动物和标记氨基酸(t_{LA})保温时间(分)

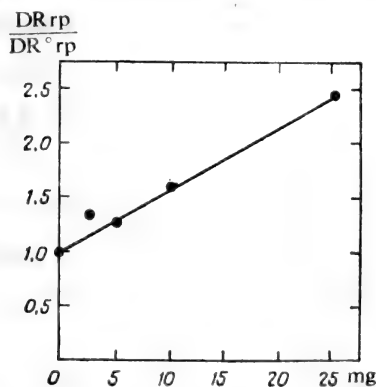


图 30 测定在金精三(羧)酸的作用下肽链«平均»合成时间对在没有
翻译抑制剂的情况下合成时间之比。给小白鼠注射 0.14 M NaCl 溶
液或者金精三(羧)酸(25 克体重 2.5~25.0 毫升), 经过 45 分钟后注
射 ^{14}C -苯丙氨酸; t_{LA}—5.83 分钟。t_s 根据公式 (5) 计算

纵座标——作用后伸长中的多肽的放射性剂量对作用前的剂量之比;
横座标——金精三(羧)酸的剂量。以 25 克小白鼠体重所用的金精三
(羧)酸毫克数表示

能阻碍动物细胞蛋白质合成系统的抗癌化 合物的作用机理分析方法

О. Ю. Абакумова

在实验和临床的化学治疗中广泛的应用各种抗癌化合物。看来,对所观察到的肯定的疗效,可作这样的解释:即肿瘤细胞比正常细胞对这些抗癌化合物的损害作用具有更大的敏感性。但是对抗癌化合物在肿瘤细胞与正常细胞之间的选择性的性质,目前仍旧不清楚。所以必须对抗癌化合物对细胞代谢的各个方面其中包括蛋白质合成系统的作用机理作进一步的分析。

所有细胞的蛋白质合成系统都是有許多组分参与其作用的,核糖体在蛋白质合成系统中起着中心的作用,因为它们把全部过程组织成为一个整体,而又催化了各个别的反应。翻译(即蛋白质合成)分成三个阶段:起始——蛋白质合成的开始,延伸——肽链的伸长过程,终止阶段——合成了的肽链从多聚核糖体复合物中释放出来。

抗肿瘤药物对蛋白质合成系统的损伤作用(包括可逆的或者不可逆的)或者是由于这些药物直接作用于翻译的某一阶段因而直接破坏蛋白质合成系统的功能,或者是由于改变系统的主要组分的合成,由此破坏了它的正常工作。

为了判断抗肿瘤药物对蛋白质合成系统功能的损伤作用,首先必须测量在细胞内蛋白质合成的绝对速度(当然,也必须弄清楚不同剂量的药物作用和测定它的作用对时间的依赖性)。为了得到关于蛋白质合成速度变化的完整的概念,应该测量已合成的多肽链和未合成的多肽链的总蛋白质放射性(从匀浆中),未合成的多肽链也就是所谓“新生的”、还与核糖体结合着的肽。为了研究

蛋白质合成速度的变化，只测量多聚核糖体(伸长着的肽被标记)的比放射性是不够的。由于 tRNA 受损害或者细胞浆中的蛋白质合成系统的其它因子受损害时，使抗肿瘤药物抑制或者加速蛋白质合成的延伸作用，这样多聚核糖体的比放射性或者与蛋白质合成速度成反比或者不起变化。

由于在细胞内蛋白质合成的速度的增加或者降低可能与细胞浆内(氨基酸库)氨基酸浓度的变化有关(Wannemacher et al., 1971), 所以必须分析组织匀浆的酸溶性组分中被研究的标记氨基酸库的比放射性。

确定了被研究的药物是直接作用于翻译过程之后，还必须弄清楚，它究竟影响翻译的哪一个阶段。当蛋白质合成的起始受阻遏时，处于工作状态的多聚核糖体的数量减少，于是不翻译的单核糖体就积累起来。用蔗糖密度梯度在高离子强度和低离子强度溶液中分析多聚核糖体物质时，用氨基酸脉冲标记蛋白质时就能发现这些变化。在具有高离子强度的密度梯度中发现不翻译的单核糖体本身解离为 40S 和 60S 的亚基。

当 tRNA 和处在细胞浆内的蛋白质合成因子受损害时，可以减慢蛋白质链延伸的过程，所以在正常起始时会与一个 mRNA 相连的核糖体的量增加，也就是多聚核糖体成为《更重》了。用蔗糖密度梯度分析这种核糖体时可以发现在多聚核糖体中核糖体的类似再分配。

直接测量多肽链合成的时间，就可以确定翻译过程以及相应的蛋白质合成链的延伸的减慢或加快(В. Л. Лейтин, М. И. Лерман 见 260 页)。也可使用 Haschemeyer 的方法(Haschemeyer, 1961; Mathews et al., 1973)。

起终止作用的蛋白质因子参加到翻译过程最后阶段——终止阶段的实现，终止因子若被抗癌药物损害，能破坏已合成好的肽链

和核糖体从 mRNA-核糖体中正常的释放。这样,在 mRNA 上处于工作状态的核糖体数目比通常显著的增多,于是多聚核糖体的质量增加。在蔗糖密度梯度中分析多聚核糖体时也能发现类似的变化。但是多聚核糖体外形的那些变化,在破坏肽链延伸阶段时也能看到,这就使对测定在终止阶段发生的损害作用带来困难。

翻译过程可由于损害蛋白质合成系统中的一个或者多个组分而破坏。为了弄清此问题,研究了三种类型的蛋白质合成系统:1) 未经分级分离的(粗制的)系统,此系统内含有除去线粒体后或者除去微粒体后的上清液和必需的补加物,2) 由多聚核糖体和细胞浆重的建系统,3) 利用添加 tRNA 的刺激系统(Абакумова и др., 1974)。

抗癌药物同样能破坏蛋白质合成系统的成分的合成。RNA, 核糖体蛋白,蛋白质的翻译因子(一个或几个)的合成受破坏,就会不可避免的导致蛋白质合成系统功能性的变化。当这些成分的合成受抑制时,而引起的蛋白质合成系统成分的不足,将与某一组分的存活时间成正比。因此在这种情况下抗癌药物的损害性影响,看来最好是在与抗癌药物长时间接触的实验中测定。将得到的组织进行分级分离,得到亚细胞结构,在蛋白质合成无细胞体系中对它进行分析。此系统中需要添加由未经药物处理过的动物组织中得到的外源成分。

下面介绍的几种方法,大体上能测定抗癌药物作用于细胞的蛋白质合成系统时的某些作用点。

测定抗癌药物对细胞内蛋白质合成速度的影响

试 剂

缓冲液 A: 0.25M 蔗糖, 5mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 25mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)。

0.1% 聚乙烯硫酸酯。

20% Triton X-100 溶液。

10%, 15% 和 50% 蔗糖溶液, 此溶液所含有的盐的成分与缓冲液 A 一样。

0.2M NaOH 溶液。

硫醚(麻醉用)。

^{14}C -氨基酸(~ 100 毫居里/mM)。

微孔过滤膜 AufS(No.3)。

甲苯闪烁体, 在 1 升甲苯中含有 3.5 克 PPO 和 0.1 克 POPOP。

Brey 氏液体, 含有 400 毫升二氧六环, 100 毫升甲醇或乙醇, 10 毫升乙二醇, 30 克苯, 2 克 PPO 和 0.2 克 POPOP, 5% 和 10% TCA。

利用带有肿瘤的动物和用作对照的健康动物。必须注意在肿瘤中不要出现坏死区域, 应用已知的或已用实验确定的抗癌药物半致死剂量 (LD_{50}) 作为最大剂量, 而所取的药物浓度要适当低一些 (通常 5~6 剂量)。抗癌药物接触时间的长短是由实验的要求来确定。

分析过程 初次注射抗癌药物时要适当的加以控制, 看它是否对多聚核糖体结构的完整性产生了有害的影响。为此, 用装有 Schlieren 光学系统的分析超离心机或者用蔗糖密度梯度制备超离心机对多聚核糖体物质进行分析, 得到多聚核糖体的沉降图。

在实验中应用氨基酸脉冲标记。将 ^{14}C -氨基酸 (~ 250 微居里/每公斤体重) 注射到腹腔内 (5~10 分钟内), 或者注射到门静脉 (1~2 分钟内)。断头杀死动物, 取出器官和肿瘤, 称重, 用冰水洗涤, 再用缓冲液 A 洗涤, 然后在这缓冲液中 (用三倍缓冲液的体积) 用聚四氟乙烯杵的匀浆器匀浆。多聚核糖体按 B. J.

лейтин 和 М. И. Лерман (1969) 的方法提取, 测量它们的比放射性, 并与对照动物的相同组织所得的多聚核糖体比放射性相比较。从匀浆取样测量细胞总蛋白质的放射性。

进行以下操作后测量已合成的多肽链的放射性: 向除去线粒体后的上清液(S_{15})添加聚乙烯硫酸酯和 Triton X-100 使最终浓度分别为 0.01 和 2%。然后把 3 毫升 S_{15} 铺到 2 毫升 15% 蔗糖溶液上, 蔗糖溶液中含的盐与缓冲液 A 一样。在 3°C $105000g$ 下离心 (转头 Ti_{50} «Spinco» 离心机 L 2.50 40000 转/分) 2 个半小时, 倒出上清液, 取试样测定蛋白质的量 (按 Lowry 法), DNA 的量 (按 А. С. Спирин 法, 1958) 和已合成的肽链的放射性。将多聚核糖体沉淀悬浮在含有 0.01% 聚乙烯硫酸酯的水内, 取样测定其浓度和比放射性。添加等体积 0.2 M NaOH 溶液和在室温中保温 5 分钟, 以除去吸附在试样上的放射性和 ^{14}C -氨基酸-tRNA。用 10% TCA 沉淀后, 在微孔滤膜上在甲苯闪烁体内测量试样的放射性, 收集组织匀浆的酸溶性组分, 测量所用的标记前体物库中的比放射性。用乙醚洗涤酸溶性组分使 pH 达到 5.0 以除去 TCA, 冷冻干燥后在氨基酸分析仪中测量。收集含有标记氨基酸的组分, 在 Brey 氏液中测它们的放射性。所得结果是以 1 克器官的湿重和 1 毫克蛋白质在 1 分钟内的脉冲数来表示。

在决定药物作用与时间的关系时, 用实验性地选择的 (或者治疗的) 剂量进行从几小时到几昼夜的不同时间的接触。材料的标记和处理如上面所述的进行。

测定药物对蛋白质合成起始过程的影响

用生长肽被标记的多聚核糖体物质, 将它铺在 10% 到 50% 浓度的蔗糖密度梯度上, 所用的蔗糖溶液含有缓冲液 A 所具有的盐分 (低离子强度溶液) 或者具有同样的盐分, 但不含有 0.5 M

KCl (高离子强度溶液)。在 10°C 4000g 离心(甩平转头 SW 25.2 离心机 «Spinco», 17000 转/分) 14 小时。把具有梯度的二个离心管底部刺孔后, 使离心管的内含物按每一组分为 40 滴, 收集一系列组分。在 260 nm 波长下测定每一组分的光密度。绘制梯度的紫外吸收图谱, 此图可分成几个区带: 重物质($>80\text{S}$), 单核糖体(80S)和亚基(60S 和 40S)区带。测定梯度内每个区带占全部物质的百分比, 测定 80S-, 60S-和 40S-颗粒的重量比和区带的比放射性。这样对多聚核糖体物质作了鉴定。将所得的结果与经过相同处理的对照动物组织所得的多聚核糖体相比较。

测定药物对不同类型 RNA 合成的影响

试剂: 缓冲液 B: 10mM NaCl, 5mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)。

5% 和 20% 蔗糖溶液, 配制在缓冲液 B 中。

0.2M EDTA 溶液。

10% SDS。

1% 酵母 RNA 溶液。

^{14}C -乳清酸(12~15 毫居里/mM)。

微孔过滤膜 AufS(No.3)。

5% 和 10% TCA 溶液。

为了了解抗癌药物的作用机理, 必须研究不同类型 RNA 的合成, 首先研究药物对 mRNA 的合成, 对 mRNA 转移到细胞质和掺入到多聚核糖体的这些过程影响。给动物注射抗癌药物, 经过 1 小时后注射 ^{14}C -乳清酸(200 微居里/1 公斤体重), 再经 1 小时后杀死动物。组织处理, 多聚核糖体的提取和放射性的测量如上所述, 所得结果是以每毫克多聚核糖体计算。

为了测定抗癌药物对核内 RNA 的合成和转移到细胞质的过

程的影响,应用以下实验图解(测量多聚核糖体的放射性):

实 验 条 件	预 期 的 结 果
2小时后给对照动物注射 ^{14}C -乳清酸。	对照 RNA 合成和转移到细胞质中(接触2小时后)。
1小时后注射 ^{14}C -乳清酸,1小时后再注射药物。	药物影响注射前所合成的 RNA 转移到细胞质中去。
1小时后给对照动物注射 ^{14}C -乳清酸。	对照中 RNA 合成和转移(1小时后)。
1小时后注射药物,再1小时后注射 ^{14}C -乳清酸。	在1小时内药物对 RNA 合成有影响。

根据第二组实验中所获得的多聚核糖体的比放射性与第一组实验所得多聚核糖体的比放射性之比,测定由药物所引起的 RNA 转移到细胞质的过程的变化,根据第四组实验所得的比放射性与对第3组实验所得的比放射性的比例可测定药物对 RNA 合成的影响。

为了测定药物对细胞核内 RNA 合成的直接影响,给动物注射药物和 ^{14}C -乳清酸后,按上述方法制备组织匀浆,然后在 4°C 800 g 离心 10 分钟:用缓冲液 A 洗涤后,将核的沉淀物悬浮在缓冲液 A 中,用来作为测定 DNA 和 RNA 含量(М. Г. Трудолюбова 见 313 页)和 RNA 的放射性的试样。

匀浆的酸溶性抽提液用来测定标记前体 RNA 代谢物的比放射性。在采用 ^{14}C -乳清酸时按 Katz, Comb 的方法 (1963) 提取 ^{14}C -尿嘧啶核苷酸后,测定它的放射性。

用蔗糖密度梯度分析多聚核糖体 RNA 时得到了药物对各种类型 RNA 合成的作用的详细特征。为了从多聚核糖体中提取 RNA,把它们悬浮在缓冲液 B 中,向悬浮液添加十二烷基硫酸钠至 0.5% 浓度和 EDTA 至 5 mM 浓度,此后溶液在 37°C 保温 1 分钟,用 5~20% 的蔗糖浓度梯度分析 RNA 的沉降图谱。用缓冲液 B

配制此蔗糖溶液。在 3°C 50000g 离心 15 小时(甩平-转头 SW25.2 离心机«Spinco», 20000 转/分)。将梯度中含有 rRNA 和 mRNA 的组分用 10% TCA 沉淀后用来测定 RNA 的比放射性。为了定量沉淀,在添加 TCA 之前向试样滴入 3 滴 1% 酵母 RNA 溶液。将沉淀物放到微孔滤膜上,并测其放射性。所得结果以细胞的每毫克 RNA 和 DNA 每分钟的脉冲数表示。

上面所引用的方法,显然不能包括全部所能采用的各种方法。但是这些方法用来显示正常细胞和肿瘤细胞蛋白质合成系统对烷基化抗肿瘤化合物(亚硝基脒)的损害作用的不同敏感性已足够了(О. ю. Абакумова и др., 1973)。

分离单种多聚核糖体的免疫化学方法

Е. В. Сидорова, М. Г. Трудюбова

为了解决以下这些问题,如 mRNA 结构的研究,单一基因的合成,某种特定的蛋白质合成的控制,翻译的机理和速度的阐明等等,都必须有单一多聚核糖体。为了研究单一多聚核糖体最适合的方法是用抗体与在多聚核糖体上伸长着的蛋白质肽链的相互作用的专一方法。这个方法的部分改良法——在载体(共沉淀)存在下用抗血清或用抗合成该蛋白质的多核糖体的纯抗体来沉淀多核糖体(Palmiter et al., 1972)。但是要得到天然的多聚核糖体(和 mRNA)会遇到一系列的困难(Halme et al., 1971)。应用三明治型专一免疫吸附剂分离单一多聚核糖体(Г. И. Дризлих, А. Е. Гурвич, 1964)可以避免某些困难。这种免疫吸附剂含有抗原-抗体的共价结合的复合物,在多聚核糖体上合成的相应的蛋白质起着抗原的作用。下面将叙述用专一的三明治-吸附剂提取多聚核糖体的方法。以合成清蛋白和免疫球蛋白的核糖体为例。

制备多聚核糖体

在试验中利用能制造免疫球蛋白(γ' X-型)的带有转移性浆细胞癌 MOPC-21A 的小鼠和大白鼠。

从浆细胞癌和肝脏细胞中按 Blobel 等的改良方法提取多聚核糖体(Blobel, Sabatini, 1971)。利用标记的多聚核糖体: 1) 标记 rRNA; 2) 标记 mRNA; 3) 标记伸长着的多肽链。在第一种情况下是给动物腹腔注射 100 微居里 ^{14}C -乳清酸到大白鼠上, 或者 10 微居里 ^{14}C -尿嘧啶到小鼠后经过 20~24 小时提取核糖体。在第二种情况下, 腹腔注射标记物后经过 4 小时提取多聚核糖体; 提取多聚核糖体前 1 小时给动物腹腔注射放线菌素 D, 其剂量为每 200 克体重 50 微克。在第三种情况下, 向腹腔或者肿瘤内注射 10 微居里 ^{14}C -小球藻水解物或者 ^{14}C -亮氨酸后, 经过 5 分钟提取核糖体。

抗原和抗体

从带有浆细胞癌的小鼠血清中按 Patter 等人的方法提取小鼠免疫球蛋白(Patter et al., 1969), 按 Corner 方法从大白鼠血清中提取血清清蛋白(Corner, 1962)。

从兔子制备抗小鼠免疫球蛋白和抗血清清蛋白的抗血清。用 300~500 微克小鼠免疫球蛋白或者血清清蛋白(在福氏完全佐剂中)在后膝下淋巴结给动物免疫, 经过一月再免疫一次。此后把 1 毫克蛋白质经三处注射: 静脉(0.2 毫克), 后淋巴结中的一个淋巴结和前肩胛骨对面的部位(各 0.4 毫克)。重复免疫后 7~14 天, 从耳静脉采血。一只兔子一次采血量不应超过 40 毫升; 在上述时间内每 2~3 天采血一次。每隔 3~5 月能够再重复免疫, 但事先应证实在动物血清中不存在抗注射进去抗原的抗体。

在抗血清中抗小鼠免疫球蛋白和血清清蛋白的抗体的含量是根据 Гурвич 等人的方法测定的(А. Е. Гурвич и др., 1962)。重复免疫后 7~14 天内它们的平均含量是 1.0~1.5 毫克/毫升。

从所得的抗血清通过 0.4 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析及 DEAE-纤维素(配制在 17.5 mM 磷酸钠缓冲液中 pH6.5)分级分离, 分离兔子 γ -球蛋白组分, 在免疫电泳上检验制剂的纯度(В. С. Цветков, 1968)。测定制剂中抗体的含量, 通常抗体占兔 γ -球蛋白制剂的 10%。在实验中只能利用免疫电泳纯的兔 γ -球蛋白制剂。

免疫吸附剂的制备和三明治-吸附剂

将小鼠免疫球蛋白和大鼠血清清蛋白连接到重氮化氨基纤维素的悬浮液中; 制备好的免疫吸附剂(小鼠免疫球蛋白-吸附剂和大鼠血清清蛋白-吸附剂)悬浮在 0.85% NaCl 溶液中, 其量是按 10~15 毫克/毫升计算(根据干重)和在 4°C 保存, 如需长时期保存建议向免疫吸附剂添加保存剂-硫醇盐或者叠氮钠。抗体的免疫吸附剂容量按 Гурвич 的方法进行测定(А. Е. Гурвич и др., 1962)。一般对小鼠免疫球蛋白-吸附剂和大鼠血清清蛋白-吸附剂, 其容量都是 300 微克抗体/毫克免疫吸附剂。

小鼠免疫球蛋白-三明治和大鼠血清清蛋白-三明治制备如下: 用相应的抗体饱和小鼠免疫球蛋白-吸附剂和大鼠血清清蛋白-吸附剂; 为此在室温中将免疫吸附剂与含有足够量抗体的兔子 γ -球蛋白溶液相混和, 用 0.85% NaCl 溶液离心洗涤 4~5 次, 用标准缓冲液 (0.1 M 磷酸缓冲液, pH7.4, 含有 0.15 M KCl 和 0.015 M MgCl_2) 洗涤 2~3 次。以通过琼脂双扩散法来控制饱和的完全程度或者用环形沉淀反应来测定在上清液中抗体的存在(А. И. Гусев, 1968)。制备好的三明治-吸附剂悬浮在标准缓冲液

中,标准缓冲液的量是按 5 毫克/毫升计算。三明治-吸附剂建议用小批量制备,其量可用于 1~2 次实验,保存不应超过二星期,因为在保存时它的容量会降低。

单一多聚核糖体的分离

将多聚核糖体悬浮在标准缓冲液中,在临使用前冷冻离心 $4 \sim 6000g$ 20 分钟使其澄清。多聚核糖体浓度的测定可用分光光度计法,采用 $E_{1\%}^{1\text{cm}}_{260\text{nm}} = 130$; 可用 5% 冷的 TCA 溶液在载体存在下沉淀多聚核糖体来测定制剂的比活力。实验中所用材料应是当天提取的,或者是前一天提取的,多聚核糖体如作短时期的保存,必须很快地在液氮中冻结。再在 -20°C 下保存。

把小鼠免疫球蛋白-三明治和血清清蛋白-三明治放到玻璃离心管中,向其添加标记的浆细胞癌或者肝脏的多聚核糖体(总体积 2 毫升),它们之间的比例是根据测定吸附剂容量后选择出来的,在 0°C 保温 30 分钟(不停地搅拌试样),保温结束后在 $2 \sim 3000g$ 离心 3 分钟把三明治-吸附剂与上清液分开,用标准缓冲液洗涤,定量的转移到微孔滤纸上,以测定已吸附的放射性。烘干后样品的放射性在闪烁计数器上测定。

测定在多聚核糖体中三明治-吸附剂的容量

为了测定三明治-吸附剂的容量,向相同份量(1~2 毫克)的吸附剂添加不同量的多聚核糖体(它的 rRNA 或者伸长着的肽是标记的),按上述的方法处理试样,制作被结合的放射性与所取多聚核糖体量之间的关系曲线。三明治-吸附剂的容量是用能够连接到 1 毫克免疫吸附剂上最大量的多聚核糖体来表示;小鼠免疫球蛋白-三明治和大鼠血清清蛋白-三明治的容量是 $\sim 200 \sim 300$ 微克多聚核糖体/1 毫克免疫吸附剂。

所有使用的化学净的器皿, 试验前在 200°C 烤箱烤 1 小时。

测定细胞多聚核糖体总量内单一多聚核糖体的数量

为此, 向不同量的免疫吸附剂 (1~5 毫克/每个试样) 添加恒定量的在伸长着的肽上作了标记的细胞多聚核糖体 (对于该吸附剂每一试样不大于 500 微克), 然后测定在三明治-吸附剂上结合的放射性占加入到试样去的放射性的百分比, 并计算出合成该蛋白质的多聚核糖体的数量。试样内三明治-吸附剂大量过剩时, 若多聚核糖体的吸附率是恒定的, 表明结合作用具有专一性。

吸附作用的专一性

为了证实结合的专一性, 把在专一的三明治-吸附剂上多聚核糖体的吸附作用与它们在免疫吸附剂上的吸附作用相比较, 在这免疫吸附剂的成分中没有抗在这些多聚核糖体上合成的多肽链的抗体。浆细胞瘤的或者肝脏的多聚核糖体, 它们的 rRNA 或者伸长着的肽 (100~500 微克) 是标记的, 把此多聚核糖体加到 1 毫克小鼠免疫球蛋白-三明治和大鼠血清清蛋白-三明治与小鼠免疫球蛋白吸附剂和大鼠血清清蛋白吸附剂上去, 测定全部免疫吸附剂上放射活性的增长和计算该多聚核糖体专一和非专一吸附剂的吸附作用的百分比。如果它在《异源》免疫吸附剂上提高吸附作用不少于 10 倍, 则此吸附作用被认为是专一的。

吸附作用专一性的直接证据是: 可溶性抗原引起的多聚核糖体结合到三明治-吸附剂上的过程存在着竞争性抑制。添加 100 微克的蛋白质 (在同源多聚核糖体上合成的或者在异源多聚核糖体上合成的) 到含有 1 毫克三明治-吸附剂和 100~500 微克多聚核糖体的试样中去。添加同源蛋白质使多聚核糖体吸附作用降低 50~60%, 加相同浓度的《异源》蛋白质不影响到专一的吸附作用

(表 27)。

表 27 同源和异源蛋白质对多聚核糖体结合到三明治-
吸附剂上的抑制作用(添加 100 微克)

多聚核糖体的 来源	在试样中多聚核糖体 的量和放射性		添加的蛋白质	结合的放射性	吸附作用的
	微克	脉冲/分		脉冲/分/毫克	抑制%
小鼠浆细胞癌 MOPC-21A	550	5742	—	130	—
	550	5742	小鼠免疫球蛋白	51	63
	550	5742	大鼠血清清蛋白	196	0
大鼠肝脏	100	14272	—	422	—
	100	14272	小鼠免疫球蛋白	395	7
	100	14272	大鼠血清清蛋白	195	55

使多核糖体吸附于三明治-吸附剂上的多聚核 糖体物质的性质

为了弄清楚被观察到的多聚核糖体的吸附作用是否由于多聚核糖体上的伸长着的肽链所决定的问题, 把在伸长着的肽上标记的多聚核糖体添加到三明治-吸附剂之前, 先用嘌呤霉素处理 (Blobel, Sabatini, 1971), 嘌呤霉素具有从多聚核糖体上«卸下»伸长肽链的能力。

这样处理能使浆细胞癌的和肝脏的多聚核糖体在小鼠免疫球蛋白-三明治和大鼠血清清蛋白-三明治的吸附作用降低 50~60%。

mRNA 和伸长着的肽的提取和分析

为了提取 ^{14}C -mRNA, 向 10~15 毫克小鼠免疫球蛋白-三明治或者大鼠血清清蛋白-三明治添加 5~10 毫克浆细胞癌的或者

肝脏的多聚核糖体, 此多聚核糖体 mRNA 是被标记的(见275页)。单一多聚核糖体的提取是在免疫吸附剂过剩的情况下进行的。试样的处理如上面所述, 洗涤除去没有被结合的多聚核糖体(每次用5~6毫升的标准缓冲液洗涤5~6次)。向洗涤过的沉淀添加0.8毫升0.02M EDTA溶液, 在0°C搅拌均匀, 混合物放置5分钟, 然后试样放到37°C的水浴中; 添加0.2毫升20%十二烷基硫酸钠, 很好的搅拌和在37°C再保温1~2分钟, 此后试样在室温下3~4000g离心5分钟, 上清液转移到离心管内, 再重复处理沉淀二次, 所有抽提物合并和测定它们的总放射性后, 在蔗糖密度梯度中分析mRNA, 同时分析原来的mRNA样品。

用15~30%的蔗糖溶液建立线形的密度梯度, 把蔗糖配制于0.1M NaCl, 0.5%十二烷基硫酸钠和5mM EDTA的0.01M

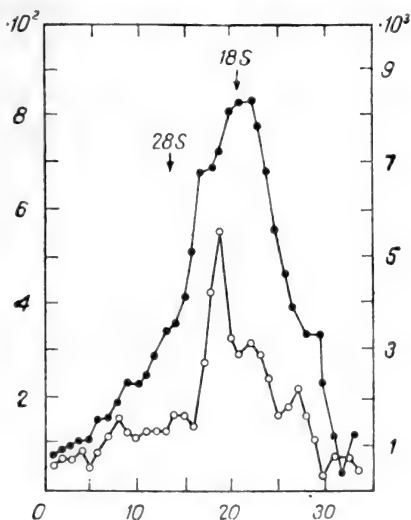


图 31 从大鼠肝脏白蛋白的多聚核糖体(白色小圆圈)和总的多聚核糖体(黑色小圆圈)所得的 mRNA 沉降图谱

纵座标——放射性(脉冲数/分) $\times 10^2$ (白蛋白的多聚核糖体)。(脉冲数/分) $\times 10^3$ (总的多聚核糖体);横座标——蔗糖密度梯度的组分编号

Tris-HCl 缓冲液中。在 22°C 75500g 进行蔗糖密度梯度离心 17 小时。

为了提取伸长着的肽链，对肽链标记的多聚核糖体作相同的处理，在所得的提取物中同样测其总放射性，用聚乙二醇浓缩抽提物和聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳 (Palmiter et al., 1971)。

图 31 所引的曲线可作为实例，此曲线是在分析大鼠肝脏细胞中所提取的单一和总的 mRNA 时所得的。在图 32 引用的是相应的伸长着的肽的电泳分析所得的结果。

最后应该指出，利用三明治-吸附剂提取单一多聚核糖体和 mRNA 的方法，此法与共沉淀的方法相比较具有一系列的优越性：1) 三明治-吸附剂不含有 RNase (不同于抗血清) 和不引起多聚核糖体的降解；2) 利用免疫吸附剂可以大大缩短多聚核糖体分级分离的时间，以减低 mRNA 破坏的可能性；3) 利用三明治-型免疫吸

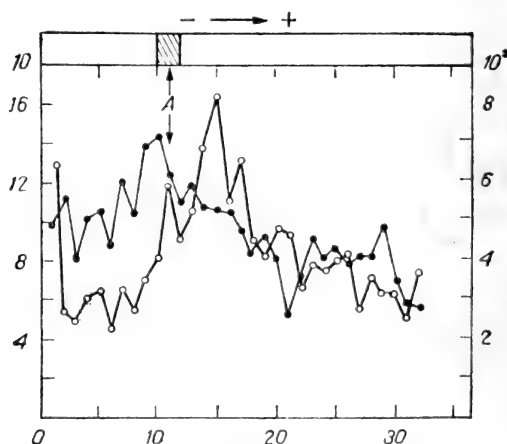


图 32 从大鼠肝脏白蛋白的多聚核糖体 (白的小圆圈) 和总的多聚核糖体 (黑的小圆圈) 所得的伸长着的多肽聚丙烯酰胺凝胶电泳
纵座标——放射性 (脉冲数/分) $\times 10$ (总的多聚核糖体), (脉冲数/分) $\times 10^2$ (白蛋白的多聚核糖体); 横座标——从聚丙烯酰胺抽提的组分编号

附剂可以抽提任何量的多聚核糖体,不必事先确定抗体和没有标记的载体之间的当量比;4)利用三明治-吸附剂能够从这些材料中抽提单种核糖体。在这些材料中,单种核糖体的相对含量不高于百分之几。

提取游离的和与细胞质网膜结合的多

聚核糖体的方法

A. E. Берман

在高等生物中,细胞内的蛋白质是在多聚核糖体上合成的,这些多聚核糖体同其他细胞内的结构不形成任何复合物(游离多聚核糖体),而分泌到细胞外的蛋白质是在与细胞质网膜相结合的多聚核糖上合成的(结合的多聚核糖体)。详细的研究游离多聚核糖体和结合多聚核糖体功能和结构的特性只能应用某些方法,即利用这些方法能够得到以各个组分形成的亚基结构时才有可能。下面叙述用于大鼠肝脏游离和结合多聚核糖体制剂的分离方法(Blobel, Potter, 1967),这个方法在其他组织(脑,肌肉,鸡胚等)的应用中也取得成功。

试 剂

配制溶液要应用重蒸馏水和高纯度的,即光谱纯和分析纯的试剂;不太纯的试剂必须进行重结晶,所有的缓冲溶液在实验开始前1~2天配制,全部配制好的溶液保存在2~4°C冰箱中。

1M Tris-HCl(pH7.6); 2.5M KCl溶液; 0.5M醋酸溶液或者氯化镁溶液;蔗糖溶液。由这些溶液配制下面四种缓冲溶液:

缓冲液A——0.25M蔗糖, 0.1M KCl, 5mM镁盐, 25mM Tris-HCl(pH7.6);

缓冲液 B——1.5M 蔗糖, 其余成分同缓冲液 A 一样;

缓冲液 C——2M 蔗糖, 其余成分同缓冲液 A 一样;

缓冲液 D——含有缓冲液 A 同样成分, 但是没有蔗糖。

所有制备工作都在 2~4°C 进行 (其中包括利用冷冻离心机)。

分离游离和结合的多聚核糖体

50~60 克组织分成几份, 每份 5~7 克, 在 2.5 倍体积 (克/毫升) 的缓冲液 A 中用带有聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器进行匀浆。用电动机转动研杵, 转速是 1500 转/分。匀浆通过二层纱布过滤, 滤液在 12000g 离心 15 分钟, 经过离心后核和线粒体沉淀。吸出除去线粒体后的上清液, 而沉淀悬浮在三倍体积的缓冲液 A 中, 与上面一样条件离心。经过第一和第二离心后的上清液合并。在体积为 12 毫升离心管中角转头 T-50 离心机 «Spinco» L-2 中建立蔗糖的密度梯度。为此向每个离心管分层地加入 4 毫升缓冲液 C 和 3 毫升缓冲液 b, 最后铺上一层体积为 5 毫升的除去线粒体后的上清液, 已建立梯度的离心管在 42000 转/分离心 20 小时。可利用转速能达到 100000g 以上的任何一个转头, 但缓冲液 b、C 和除去线粒体后的上清液的体积比例仍应按照上面所述的比例。

在长时间的离心时游离的多聚核糖体的密度高于缓冲液 C 的密度而沉到离心管底部, 而与膜结合的多聚核糖体的密度低于这缓冲液的密度, 则聚集在缓冲液的上面, 呈有色的凝结块。不与多聚核糖体结合的膜 (非颗粒的网或光滑的内质网) 在缓冲液 b 中。离心以后, 用具有宽头末端的吸管吸出结合的多聚核糖体 (为使吸起来方便, 吸管用橡皮管与针筒连接), 然后吸出和弃去在沉淀上面的液层。含有游离多聚核糖体的沉淀用缓冲液 D 稍微漂洗一下, 用小的匀浆器将此沉淀悬浮在 3~4 毫升缓冲液 D 中。向结合的多聚核糖体添加等体积缓冲液 D, 悬浮在匀浆器中混合后在

105000g 离心 1 小时。含有结合核糖体的沉淀悬浮在 3~4 毫升缓冲液 D 中, 吸取游离和结合的多聚核糖体悬浮液每种各 0.1~0.2 毫升, 用来测定蛋白质或者 RNA。剩余的部分可用来作为蛋白质合成无细胞系统中能合成蛋白质的结构的来源 (组成这个系统的原则和它的组分的计算, 见后面, A. E. Берман, 见 333 页)。

在多聚核糖体从与它结合的膜释放出来以后, 往往需要分离结合多聚核糖体。用去垢剂使多聚核糖体与膜分开: 离子的 (脱氧胆酸钠), 非离子的 (Triton X-100) 或者两者的混合物。除去膜的多聚核糖体, 与游离核糖体相似, 在离心作用下经过 2M 蔗糖溶液层而沉淀。向 8 毫升结合多聚核糖体悬浮液中添加 0.8 毫升含有 13% 去氧胆酸钠和 10% Triton X-100 的溶液 (溶液在使用前配制)。经过 15 分钟后将混合液铺层到在离心管中的 3 毫升缓冲液 C 上, 用转头 T-50 在 115000g (42000 转/分) 离心 4 小时。将沉淀用缓冲液 D 稍微漂洗一下, 悬浮在 3~4 毫升同一缓冲液中。

从 50~60 克组织可以提取 100~120 毫克纯化的多聚核糖体 (游离的加结合的)。游离的多聚核糖体和同细胞质网膜结合的多聚核糖体产量的比例决定于所用的材料。例如, 从大鼠肝脏提取所得游离的多聚核糖体和结合的多聚核糖体的量是相等的 (Erken, 1973)。多聚核糖体悬浮液在 -20°C 能够保存二天不丧失在无细胞系统中合成蛋白质的活性。

从 80S 核糖体制备有生物活性的核糖体亚基的方法

О. Ю. Абакумова

为了解决一系列的任务, 如核糖体颗粒的拆开和重建, 弄清楚单个核糖体蛋白的结构和功能, 分析蛋白质合成不同阶段的机理等等, 都要利用功能上有活性的核糖体亚基。在哺乳动物细胞质

内, 40S 和 60S 两个核糖体亚基可形成 80S 能转译的核糖体, 进入到多聚核糖体的组成中去, 也能形成单个的非转译的核糖体。除此之外, 40S 和 60S 亚基也可以以所谓天然核糖体亚基的形式彼此单独地存在。通常这二种颗粒以相等数目存在于细胞内。它们在多聚核糖体和单个核糖体储存库之间以一定比例分布而存在, 但是大部分是天然的核糖体亚基。

在 80S 的可转译核糖体中两个亚基之间的结合是很牢固的。为了使它们解聚, 必须破坏核糖体同 mRNA 和肽酰-tRNA 结合的键。使 80S 可转译的核糖体解聚的方法之一是从介质中完全除去 Mg^{2+} , 但是为了使绝大部分 80S 可转译的核糖体解聚, 必须有高浓度的 K^+ 或者如 EDTA 那样强的螯合剂的作用。但是在这些条件下的解聚作用伴随着核糖体亚基不可逆的结构的变化, 或者核糖体蛋白结构的变化。这样的亚基通常丧失了在无细胞系统中合成蛋白质的能力, 并且它们不能再缔合成符合要求的核糖体。

单个的不能转译的核糖体稳定性较低, 在低的 Mg^{2+} 浓度下或者在相当高的 K^+ 浓度下容易解聚(Д. Файс и др., 1970; Martin, 1973)。此时所形成的衍生物 40S 和 60S 亚基具有在无细胞系统内合成多肽的能力(Д. Файс и др., 1970)。在一般条件下在正常的活细胞内, 例如肝脏细胞内, 单个核糖体的含量是不高的(约在 10%)。因此, 为了制备具有生物活性的足够量的亚基必须使具有转译作用的核糖体转变为无转译作用的核糖体。

把具有转译作用的核糖体转变成无转译作用的核糖体后, 再使它们解聚成具有生物活性的亚基。此步骤可用溶于高离子强度溶液中的嘌呤霉素来处理多聚核糖体制剂来实现。在肽链形成时嘌呤霉素和伸长着的肽之间形成肽-嘌呤霉素, 后者不能在核糖体上待住, 于是使它从核糖体上释放到介质中, 从而使转译作用停止。所形成的无转译作用的核糖体在高离子强度的溶液中发生解

聚(Villa-Trevino et al., 1964)。但是在这里由于采用高浓度的KCl (高到 0.88M) 能引起小亚基蛋白质的丢失和改变它的功能特性(Wettenhall et al., 1973)。这个方法被用来积累无转译作用的核糖体, 但是此法要求大量昂贵的嘌呤霉素。

在蛋白质合成无细胞系统内将已纯化的多聚核糖体保温时同样能得到无转译作用的核糖体。在这些条件下所有工作着的核糖体完成了已开始合成的多肽链的合成, 在转译作用结束后就从多肽链中释放出来, 以单个核糖体形式积累在细胞质内, 此单个核糖体是不含 mRNA 的(Falvey, Staehelin, 1970)。用高离子强度的溶液例如 0.5M KCl 溶液处理这些单个核糖体可把它容易地解聚为亚基。这个方法需要消耗大量的昂贵试剂(无细胞系统的全部组分), 因此不太适用于大量制备的目的。

上面所叙述的无转译作用的核糖体的积累方法是属于所谓 in vitro 的方法。当从细胞中提取出纯的多聚核糖体制剂进行研究时, 如果应用能抑制转译起始作用的物质, 例如氟化钠或者乙硫氨酸(结构上类似甲硫氨酸), 可以显著的增加单个核糖体的量。

当乙硫氨酸作用到肝脏细胞时发生了多聚核糖体和单个核糖体储存库之间核糖体颗粒的再分配, 绝大部分的核糖体(~70%)是以单个核糖体的形式存在, 它不与 mRNA 和肽酰-tRNA 结合(以后我们将称它们为《乙硫氨酸核糖体》)。单个核糖体的积累是由于乙硫氨酸的作用, 它显著的抑制了核糖体结合到 mRNA 的起始因子结合部位的过程。除去抑制剂后, 乙硫氨酸核糖体又迅速地参加到转译作用中去, 在细胞内恢复了蛋白质的正常合成, 这说明并不存在核糖体的损害。事实上从乙硫氨酸核糖体所得的亚基保留着重新缔合为原来的核糖体的能力, 保留着在无细胞系统的条件下合成多聚苯丙氨酸的能力(О. Ю. Абакумова и др., 1973)和保留结构的完整性(Н. А. Киселев и др., 1973)。

下面叙述用乙硫氨酸制备核糖体亚基的方法, 这个方法使有可能从不同动物的肝脏细胞得到大量的具有生物活性的 40S 和 60S 亚基。

核糖体物质的制备

溶 液

溶液 I: 0.25 M 蔗糖, 0.005 M $MgCl_2$, 0.05 M KCl, 0.025 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6)。

溶液 II: 0.001 M $MgCl_2$, 0.01 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6)。

溶液 III: 0.005 M $MgCl_2$, 0.01 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6)。

乙硫氨酸溶液: 200 毫克乙硫氨酸溶于 6 毫升 0.85% NaCl 溶液内。

溶液 I ~ III 应用无离子水配制, 在室温下将 pH 调到 7.6。

乙硫氨酸核糖体的提取

从大鼠肝脏中制备乙硫氨酸核糖体制剂时, 最好利用雌性的动物, 因为它比起雄性动物来, 在注射乙硫氨酸后很明显的降低了在肝脏内蛋白质的合成 (Schlunk et al., 1968)。乙硫氨酸溶液的用量按动物的每克体重用 1 毫克计算, 在使用前配制。由于在室温下乙硫氨酸不易溶解, 因此要在 $100^{\circ}C$ 中溶解, 把此溶液冷却到 $60^{\circ}C$ 后注射到动物腹腔中。把此动物放过夜, 只给它饮水。注射乙硫氨酸后 16~17 小时, 断头杀死大鼠, 很快的取出肝脏, 称重和仔细的用冰水洗涤, 然后用冰过的溶液 I 洗涤, 所有步骤都在 $3\sim4^{\circ}C$ 冷库内进行, 乙硫氨酸核糖体制剂的制备是在 $2\sim3^{\circ}C$ 的离心机内进行的。利用了 В. Л. Лейтин 和 М. И. Лерман (1969) 的方法制备核糖体物质。乙硫氨酸核糖体的产量是每克肝脏 4~6 毫克。

所得乙硫氨酸核糖体制剂对溶液Ⅱ透析过夜，在透析时不溶解的物质在 $3\sim 4^{\circ}\text{C}$ $4\sim 5000\text{g}$ 离心 10 分钟分离，测定上清液中乙硫氨酸核糖体的浓度和所得制剂的纯度。为了定性和定量鉴定乙硫氨酸核糖体制剂的组成，在 138800g （离心机《Spinco-E》用 AN-D 转头， 43700 转/分，角度 60° ）在蔗糖的线形浓度梯度内进行沉降分析。可以应用 $10\sim 50\%$ 的蔗糖浓度梯度。蔗糖溶液在溶液Ⅱ中配制。 10°C 65000g （ 23000 转/分在 SW25.2 离心机《Spinco》L2.50 吊篮转头）离心 8 小时。按照 Markhem 的方法计算沉降常数（В. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1969）。

乙硫氨酸核糖体的解聚条件

乙硫氨酸核糖体在含有 0.5M KCl 的溶液Ⅲ内进行保温时就解聚（ 37°C 保温 30 分钟）。在这溶液内 $\text{K}^{+}/\text{Mg}^{2+}$ 克分子浓度的比是 100。这是为了保持乙硫氨酸核糖体解聚时所形成的 40S 和 60S 亚基结构的完整性的最适条件。当 $\text{K}^{+}/\text{Mg}^{2+}$ 的比例是 500 时，就可从原来颗粒中分离出大量的物质（可能是蛋白质），当用 Schlieren-光学系统作分析时这些物质沉降并形成一个月牙形区带内（О. Ю. Абакумова и др., 1973）。

分离和提取 40S 和 60S 颗粒的条件

将乙硫氨酸核糖体的解聚产物铺在 $10\sim 50\%$ 蔗糖线形浓度梯度上。蔗糖溶液是配制在含有 0.5M KCl 的溶液Ⅱ中。在这溶液内 $\text{K}^{+}/\text{Mg}^{2+}$ 的克分子浓度之比是 500，这个比值对于定量的分离亚基是最好的。在吊篮转头 SW25.2 的一个离心管中（体积为 50 毫升）可分离 40 毫克乙硫氨酸核糖体的原始物质。在 10°C 50000g （ 20000 转/分）离心 $12\sim 13$ 小时。在这样的解聚和离心条件下 60S 和 40S 颗粒的质量之比是 $2.7:1$ ，这与理论比值一样。

在蔗糖密度梯度中进行分级分离后所得颗粒的溶液可用下列几个方法进行浓缩。

1. 在带有梯度的离心管中从含有 40S 和 60S 颗粒的峰位的区带内取出组分, 将它们合并后用冰冷却, 并向此溶液添加 3 倍体积的冷乙醇和浓的 MgCl_2 溶液使溶液中 MgCl_2 的浓度达到 8 m M。仔细的搅拌后在冰箱的冰格上放置 30 分钟。4~5000g 离心分离出亚基的沉淀物, 悬浮在作进一步分析所必需的溶液中。

2. 从梯度组分沉淀亚基是应用角转头 Ti-50 («Spinco» L 2.50), 在 3°C 150000g 离心 3 小时, 沉淀物悬浮在溶液Ⅲ内, 在 10000g 离心分离出不溶性物质。

3. 从梯度离心管所得的亚基溶液加到 Sephadex G-75 的柱上(柱的直径 1 厘米, Sephadex 的高度 10 厘米), 先用溶液Ⅲ平衡。用溶液Ⅲ洗脱, 收集组分(每管 1 毫升), 主要的物质是在洗脱出来的第一第二组分内。

如果乙硫氨酸核糖体和它们的亚基不立刻使用时, 那么应向它的溶液添加蔗糖到最终浓度为 5%, 在液氮中冷冻和在 -20°C 保存。

乙硫氨酸核糖体亚基再缔合的条件

从含有 60S 和 40S 颗粒的溶液所得的物质, 以 2.5:1 的比例合并, 对溶液Ⅱ透析过夜, 然后向它添加 MgCl_2 溶液至最终浓度为 0.07 M, 在 35000g 离心 40 分钟, 沉淀物悬浮在冰水中, 对溶液Ⅱ透析 2 小时。在上述条件下乙硫氨酸核糖体亚基几乎完全聚合为原来的 75S 核糖体。为了测定原来的和再缔合后形成的乙硫氨酸和它们亚基的生物活性, 可用蛋白质合成的无细胞系统下分析这些颗粒合成多聚苯丙氨酸的能力(О. Ю. Абакумова и др., 1973)。

在 K^+ 和 Mg^{2+} 的克分子浓度比为 10~20 的蔗糖溶液中对亚

基作沉降分析,能够判断亚基制剂的均一性。在蔗糖密度梯度中进行第一次分离后,40S 亚基可被提纯,而 60S 亚基则含有 80S 组分,为了把它们制备成纯的形式必须作进一步的纯化处理,其办法是把 60S 颗粒的物质在 K^+/Mg^{2+} 比例是 10~20 的蔗糖密度梯度溶液中离心纯化。40S 颗粒的得率约占取来分析的总核糖体物质的 30%,利用转头 SW 25.2 的一个实验中得到 25~30 毫克的 40S 亚基。

心肌核糖体的提取与研究

М. П. Явич

从骨骼肌和心肌制备核糖体通常应用水-盐介质,这介质原是从提取肝脏核糖体之用的(Earl, Korner, 1965; Breuer, Florini, 1965; Zak et al., 1967)。这些方法的特点是所应用的溶液是低离子强度的。通过这种方法制备的肌肉核糖体似乎没有完全除去杂蛋白。例如骨骼肌的核糖体在 A_{260/235} 吸收的比值是 1.4; 心肌核糖体是 1.22, 这比纯化的核糖体的相应数值要低。这些方法的第二个缺点是:在低离子强度的缓冲液内,将肌肉组织匀浆化后,把匀浆在低速离心时大量的核糖体与细胞核,肌原纤维和线粒体一起沉淀,而保留在除去线粒体后的抽提液中的核糖体只占细胞 RNA 总量的 10~15%,很可能也没有反映出肌肉核糖体结构的多样性。

众所周知,心脏内大量的核糖体是同肌原纤维相连的,并且根据电子显微镜的材料,核糖体是分布在肌小节(sarcomere)之中。就是在这些核糖体上实现肌动球蛋白复合体的蛋白质的合成。为了使肌原纤维溶解要求高离子强度的缓冲液。在这些条件下肌原纤维和与肌原纤维相连接的核糖体不再同核和线粒体一起沉淀,

而停留在除去线粒体后的抽提液中。

高离子强度的缓冲液 ($\eta 0.3$) 被 Heywood 等用来从鸡胚的心脏肌纤维和骨骼肌纤维中制备核糖体 (Heywood et al., 1968)。把这个方法稍微改良一下, 能够从成年大鼠心肌中提取较大量的核糖体, 并且所得的核糖体一半是多聚核糖体。

下面叙述制备和分析成年大鼠心肌核糖体的方法。

试 剂

缓冲液 I: 250mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM Tris-HCl (pH7.6)。

缓冲液 II: 10mM $MgCl_2$, 10mM Tris-HCl (pH7.6)。

20% Triton X-100 溶液, 使用前配制。

10% 和 40% 蔗糖溶液。为了配制 50 毫升蔗糖密度梯度溶液, 取 2 份原始溶液 (供给混合器) — 23.4 毫升 40% 蔗糖溶液和 26.6 毫升 10% 蔗糖溶液。

0.5M EDTA 溶液 (pH7.4)。

所有上述溶液都用无离子水配制。

5% 和 10% TCA 溶液。

^{14}C -乳清酸; 溶于热水中, 添加少量的 Na_2CO_3 到 pH7.4。

RNA 溶液 (《Reanal》匈牙利), 配制成 1 毫克/毫升的溶液。用 Na_2CO_3 或者 NaOH 溶液中和。

牛胰核糖核酸酶 (《Merk》西德), 配制成 15 微克/毫升。

测量放射性的闪烁液: 3.5 克 PPO 和 0.1 克 POPOP 溶解在闪烁液用甲苯中, 并调到 1 升。

核糖体物质的制备

断头杀死动物, 迅速取出心脏, 用冰水洗去血污, 用滤纸吸

干, 用剪刀剪成小块, 用 4 倍体积的冷缓冲液 I 与粥状物搅匀, 再添加 20% Triton X-100 使最终浓度达到 0.5%。组织先在 Waring 匀浆器内捣碎 (30 秒钟, 8000 转/分), 然后在带有聚四氟乙烯杵的 Potter 玻璃匀浆器中匀浆。而且先用松杵匀浆器匀浆 (5~6 个来回), 然后用较紧的杵的匀浆器匀浆 (同样来回 5~6 次), 匀浆器放于带有冰的杯子中, 全部过程都在 4°C 冷室内进行。

心肌匀浆迅速地通过二层纱布过滤, 在 12000g 离心 15 分钟, 以除去没有被破坏的细胞, 核和线粒体。除去核和线粒体的心肌细胞质抽提液用 4 倍体积缓冲液 II 稀释, 在冰浴中放置 15 分钟, 被稀释的除去线粒体后的抽提液由于离子强度的降低, 在以后的离心过程中 (12000~15000g, 15 分钟) 核糖体就沉降到沉淀中, 小心地把沉淀悬浮在少量体积的缓冲液 I 中。以制备规模制备核糖体时在 2~3°C ЦБР-1 离心机中进行离心。

按 Спирин 法测定心肌匀浆液中、除去线粒体后的抽提液中及核糖体制剂中 RNA 的含量 (A. C. Спирин, 1958)。除去线粒体后的心脏抽提液中 RNA 的含量约占匀浆中总的 RNA 含量的 57%, 每 1 克湿重组织核糖体制剂约含 0.5 毫克 RNA。核糖体的产量比在低离子强度缓冲液内心脏组织匀浆化时所得的核糖体制剂的产量约高 4 倍。

核糖体的分析

使用高浓度钾的缓冲液所制备的核糖体制剂会被蛋白质可能是肌球蛋白污染。它们在 A_{260/280} 吸收的比值是 1.45~1.5。在蔗糖浓度梯度中对除去线粒体后的抽提液进行沉降分析时发现其它蛋白质存在。考虑到这种情况, 为了研究心脏核糖体的结构, 最好是采用沉降分析并结合使用 RNA 标记的方法。

给大鼠注射 ^{14}C -乳清酸, 其量是每一个大鼠 100 微居里。接触时间是 48 小时。经过这段时间后在核糖体 RNA(rRNA) 和转移 RNA(tRNA) 内同位素被富集。在沉降分析时 tRNA 局限在蔗糖梯度的上层组分中, 因此, 蔗糖浓度梯度组分的主要部分是核糖体。

沉降分析按下列方式进行。将 4 毫升除去线粒体后的心肌抽提液(配制在缓冲液 I 内) 铺层到蔗糖线形梯度上(用缓冲液 I 配制, 10~40% 蔗糖浓度), 在 4°C 64000g(23000 转/分用吊篮转头 SW25《Spinco》离心机) 离心二小时。

离心结束时, 在离心管底部穿孔, 每组分收集 45 滴。为了测定单个核糖体组分中的放射性, 向每一试样添加 0.2 毫克酵母 RNA 作为载体和 10% TCA 溶液使最终浓度为 5%。将沉淀放到微孔过滤纸(《Aufs》) 上, 用冷的 5% TCA 洗涤, 再用乙醇洗涤, 干燥。用闪烁计数器测量沉淀的放射性。

心肌核糖体的沉降剖面图如图 33 所示(曲线 1)。根据放射性

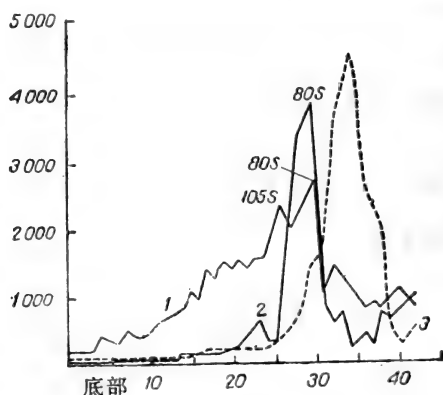


图 33 大鼠心肌核糖体沉降剖面图

1——对照; 2——用核糖核酸酶处理过的除去线粒体后的抽提物;

3——用 EDTA 处理过的除去线粒体后的抽提物

纵座标——组分的放射性脉冲/分; 横座标——蔗糖密度梯度组分的编号, 从离心管底部开始

的分布,其特征是在单体(80S)和二聚体(105S)区域中具有一个尖峰。

测定心脏核糖体总的制剂内多聚核糖体的量是将含有转译作用的核糖体和无转译作用的核糖体(二聚体,单体和亚基)两者的梯度组分中的放射性的累加值来计算的。因为从第36个试样开始梯度上面的峰有红色(这是由于存在着血红蛋白之故),所以亚基的定位主要是按单体峰的分布来估计的。

根据心肌核糖体沉降剖面图证明多聚核糖体的存在

在心肌核糖体群中存在多聚核糖体,这可用核糖核酸酶或者EDTA溶液处理除去线粒体后的心脏提取物来加以证实。在第一种情况下心肌细胞质提取物在铺层于蔗糖梯度上之前先与牛胰核糖核酸酶保温15分钟。在第二种情况下向除去线粒体后的心肌组分添加0.5M EDTA溶液使最终浓度达到0.02M。在这个实验中蔗糖梯度是在仅含有0.250 KCl和10mM Tris-HCl (pH 7.4)的缓冲液中配制的。

用小剂量的核糖核酸酶温和地处理多聚核糖体,可引起mRNA的分解和使多聚核糖体断裂成单体。添加EDTA由于从溶液和颗粒中除去 Mg^{2+} 也会使核糖体解离为亚基。核糖核酸酶和EDTA的这些效应能够在核糖体的蔗糖密度梯度沉降剖面图上观察到(见图33)。

因此,应用Heywood和其同事的方法,从成年大鼠心肌中能够分离出较大量的核糖体,并且约有50%是多聚核糖体。用高离子强度的缓冲液所抽提到的心肌核糖体,看来,是心脏核糖体结构主要的甚至是全部的类群。

动物细胞的亚细胞组分中 RNA 和 DNA 的定量测定

М. Г. Трудюлова

在制备动物细胞的各种亚细胞组分(核, 线粒体, 微粒体, 多聚核糖体等等)时必须严格的检查所得制剂的纯度和均一性。主要原因之一是细胞质的组分会被核物质(DNA)污染(不适当的匀浆, 导致核的破坏)。因此为了检验细胞质组分的纯度必须定量测定它们中的 DNA。为了很好的鉴定组分的纯度和均一性, 要测定 RNA/蛋白质和 RNA/DNA 的比例。蛋白质的含量通常是用 Lowry 的方法测定, 下面介绍最常采用的和最准确的测定动物细胞亚细胞组分中 RNA 和 DNA 的方法。

测定 RNA 的方法的依据是按 Schmidt, Thannhauser 的方法进行分级分离, 然后用分光光度法测定(Schmidt, Thannhauser, 1945)。分级分离包括按次除去酸溶性组分和脂类物质, 用碱及酸水解核酸与蛋白质以进行分离和测定。在经典的方法中这个方法是非常费力的。Fleck, Munro(1962)详细地分析了这个方法, 得出结论, 碱水解(1M KOH 溶液)时间的长短强烈地影响 RNA 的定量测定。因此作者建议把碱水解的时间缩短为 1 小时和减低碱的浓度到 0.3 M。除此之外, 他们也证明了, 在样品中脂类物质的存在不影响 RNA 测定的准确性。而且事先抽提出脂肪会导致在研究材料中 RNA 的大量损失 (О. Ю. Абакумова 见 320 页)。为了测定动物细胞匀浆中和被染色的亚细胞组分中 RNA 的量, 最适合的是利用 Blobel 和 Potter 1968 的方法; 这二人考虑了 Fleck 及 Munro 所指出的应注意之点, 并且自己作了一系列重要的改进。

试剂: 0.3M, 0.5M 和 0.6M HClO_4 溶液, 0.6M KOH 溶液。

测定过程: 测定是在严格冷却的条件下在离心管内进行的。
安排 4~5 组平行试样。

向 0.1 毫升试样添加 1.9 毫升 0.3M HClO_4 溶液。为了彻底沉淀酸溶性组分, 将离心管放在冰浴中 15 分钟。然后在 2000~3000g 离心 10~15 分钟, 沉淀用 0.2M HClO_4 溶液洗涤二次。离心后, 离心管壁小心用纱布或者滤纸擦干, 为的是避免沉淀组分被上清液中酸溶性物质污染。

沉淀先用玻璃棒研碎, 悬浮在 0.5 毫升水中, 然后在室温下添加 0.5 毫升 0.6M KOH 溶液。此时悬浮液澄清。如果沉淀直接悬浮在 0.3M KOH 溶液中, 会迅速的形成凝胶状的沉淀, 此沉淀甚至在 37°C 水解 1 小时后也不溶解。经过 37°C 1 小时保温后将离心管放到冰浴中使水解停止。

向每个离心管添加 2 毫升 0.6M HClO_4 溶液, 在冰浴上放置 15 分钟。2~3000g 离心 10 分钟。合并平行试验的上清液, 在波长 260nm 下测量 RNA 的含量。离心管壁小心地擦干, 因为沉淀需进一步用来测定 DNA。

为了把 260 nm 光密度的数值折算成 RNA 的毫克数, 可应用 $E_{1\text{cm}, 260}^{1\%} = 312$ 。

对于核糖体组分(通常是没有颜色的)中 RNA 的测定可以利用简易的方法 (A. C. Спирин, 1958)。把 0.1 毫升核糖体组分 (3~4 组平行试验) 加到 3 毫升 0.5M HClO_4 溶液中, 放到带有玻璃球帽的玻璃管中, 在沸水浴上水解 20 分钟。冷却和离心后在分光光度计波长 270 nm (D_{270}) 和 290 nm (D_{290}) 以对照管作空白测定上清液的光密度, 对照管中含有 0.5M HClO_4 及 0.1 毫升的水以代替 0.1 毫升核糖体组分。可应用 Спирин 公式计算(见 A. C. Спирин, 1958):

在 1 毫升上清液中 RNA 的微克数 = $\frac{D_{270} - D_{290}}{0.19} \times 10.5$ 。

可用这个方法来测定沉淀内 DNA 的含量（此沉淀是在测定 RNA 时碱不溶部分，见 297 页）。把带有沉淀的试管弄干，注入 0.5M HClO₄ 溶液每管 3~5 毫升（试样的体积需准确）。在沸水浴中在带有玻璃球帽（以避免体积的变化）的试管内水解 20 分钟。用以下的公式进行计算。

1 毫升上清液中 DNA 的微克数 = $\frac{D_{270} - D_{290}}{0.19} \times 10.1$

按上面的方法进行的所有测定所得出的结果与文献资料完全一致。

从哺乳动物细胞中提取和纯化含有 多聚(A)的 mRNA 的方法

Е. В. Любимова, О. В. Подобед

由于在 mRNA 中存在有多聚(A)的序列，它与 3'-末端共价连接，这就有可能制订提取含有多聚(A)的 mRNA 的方法。此法是基于 mRNA 的多聚(A)片段在高离子强度的溶液中能与固定在纤维素上，Sephrose 上或者玻璃纤维过滤器上的多聚(U)-或者多聚(dT)-聚合体形成复合物。

提取含有多聚(A)的 mRNA，可用下列物质作为起始材料：a) 多聚核糖体的总 RNA；b) 事先经 EDTA 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 处理过的多聚核糖体。

试剂和溶液

酚，结晶酚在使用前蒸馏（根据 Draper 和 Pollard (1949) 的

方法)。保藏在 $5\sim 6^{\circ}\text{C}$ 。在提取 RNA 之前将酚用缓冲液饱和, 和氯仿按 1:1 比例混和。

除去酒精杂质的氯仿(市售的制剂中含有此杂质)。将氯仿与水一起振荡, 蒸馏(收集 61.2°C 的组分)。

96% 乙醇。绝对乙醇。

薄层层析用微晶纤维素(牌号《Chemapol》, 捷克)。

多聚尿苷酸钾盐(牌号《Calbiochem》美国)。

多聚腺嘌呤核苷酸钾盐(牌号《Reanal》匈牙利)。

0.5M EDTA 溶液(pH7.5)。

20% 十二烷基硫酸钠。

含有 0.1M NaCl 的 0.01M Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)(用于提取和上样到柱上用)。

含有 0.01% 聚乙烯硫酸酯的 0.01M Tris-HCl 缓冲液(用于溶解 RNA)。

含有 0.01M EDTA 的 0.01M Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)。

0.25% 十二烷基硫酸钠, 90% 甲酰胺(用于从柱中洗脱 mRNA)。

0.01M Tris-HCl 缓冲液(pH9.0)。

1M HCl 溶液; 1M 和 3M NaCl 溶液。

提取总的多聚核糖体 RNA

已经确定, 用一般酚-去垢剂法在室温下和 pH 近于中性的情况下所提取的 RNA 中, 含有多聚(A)的 mRNA 已被丢失了(这是由于它进入到酚层或者中间层中), 并使多聚(A)从 mRNA 分子上丢失(Perry et al., 1972)。为了防止含有多聚(A)的 mRNA 的丢失, 改良了提取 RNA 的方法。在 60°C (Г. Л. Георгиев и В. Л. Мантьева, 1962) 和 pH9.0 下 (Brawerman et al.,

1972)进行 RNA 的提取,用于脱蛋白的酚和氯仿的混合液的比例为 1:1(Perry et al., 1972)或者在去蛋白之前用 EDTA 处理多聚核糖体(Darnell et al., 1971)。

将多聚核糖体的沉淀溶解于用于提取的缓冲液内,其浓度是 2~3 毫克/毫升,放到带有磨口塞的烧瓶中,添加 0.5M EDTA 溶液到最终浓度为 0.02M,然后添加 20% 十二烷基硫酸钠到最终浓度为 0.5%。混合物用手振荡几秒钟,然后加入等体积酚和氯仿的混合液(此混合液先用提取用的缓冲液饱和)。混合液在室温下在振荡器上强烈振荡 20 分钟。在 3~5°C 2500~3000g 离心 25 分钟分相。水层用注射器或者吸管吸出,放到带有磨口塞的干净的烧瓶中,而酚层和中间层再进行重复的提取(用含有 0.5% 十二烷基硫酸钠的 1/2 体积的缓冲液进行提取)在第一次和第二次抽提所得的水相合并,重复的去蛋白三次,每次用等体积的酚-氯仿(用提取用的缓冲液所饱和)新配的混合物。

在这个分级分离阶段,相分开后中间层应该完全消失。如果还有少量可见到的中间层,那么应该重复的再去蛋白一次。去蛋白完毕后,向水层添加 3M NaCl 溶液到最终浓度为 0.1M,添加 3 倍体积预先冷到 -20°C 的 96% 乙醇,在 -20°C 放置过夜。在 2500~3000g 离心 20 分钟,收集 RNA。把它溶解在含有 0.01M Tris-HCl(pH7.6)和 0.01% 聚乙烯硫酸酯(Rnase 的抑制剂)的冷缓冲液中。向 RNA 溶液添加 1M NaCl 溶液到最终浓度为 0.1M 和 3 倍体积冷的 96% 乙醇。再重复沉淀 3~4 次。RNA 的浓度和它的纯化程度可在波长 235, 260 和 280 nm 下测定 RNA 溶液的光密度值而实现。对于纯的 RNA 具有下列的比值

$$\frac{A_{260}}{A_{235}} \geq 2.3 \quad \text{和} \quad \frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 2.0$$

根据标记测定,用此方法提取肝脏多聚核糖体 mRNA 的产量

是90~95%。测定是在有少量放线菌素D存在下进行的,(在这条件下只有 mRNA 被标记)。

吸附法在用多聚(U)-纤维素吸附法从多核糖体上分离 带有多聚(A)的 mRNA

不能用苯酚法制备不含 rRNA 杂质的 mRNA 制品,所以必须采用带有多聚(U)-或多聚(dT)-纤维素柱专一地吸附 mRNA。

制备多聚(U)-纤维素

15 克纤维素放到玻璃漏斗上,按次用 200 毫升 96% 乙醇,100 毫升 1M HCl 溶液,500 毫升蒸馏水洗涤,然后再用 100 毫升乙醇进行洗涤。洗涤过的纤维素在 37℃ 烘箱中放置 24 小时使其干燥。然后添加 15 毫升多聚(U)溶液(用无离子水作溶剂),它的浓度是 8 毫克/毫升,加量按 1 毫升多聚(U)溶液对 1 克纤维素计算。把所得的浆状物很好的搅拌成等湿度的纤维素,冷冻干燥。纤维素和多聚(U)的混合物分放到培养皿中,每只培养皿放 1 克,将每份纤维素小心地悬浮在 10 毫升绝对乙醇中。培养皿放到距紫外光灯 20 厘米处(功率 45 伏特)照射 30 分钟。在这个时间内多聚(U)同纤维素发生了缝合作用。然后把培养皿的内含物合并,倒入玻璃漏斗上,用 200 毫升 0.5% 十二烷基硫酸钠洗去未结合的多聚(U),然后用无离子水洗涤,直到洗涤液中没有任何多聚(U)为止。

一般 1 克纤维素能结合 0.3~0.4 毫克多聚(U)。多聚(U)-纤维素可在 -20℃ 乙醇内保存一个月(Sheldon et al., 1972)。

测定多聚(U)-纤维素的容量

在乙醇中保存的 1 克多聚(U)-纤维素装到恒温柱上,柱的大

小是 0.9×15 厘米，带有玻璃过滤器。装有多聚(U)-纤维素的柱用缓冲液平衡后，使多聚(A)溶液通过柱子，多聚(A)的浓度为 0.8 光密度值 (260 nm，在同一缓冲液中)，流速为 0.5 毫升/分。用多聚(A)溶液来饱和多聚(U)-纤维素，一直要进行到流出的光密度相等于加进去的多聚(A)溶液的光密度时为止。一般要完全饱和 1 克多聚(U)-纤维素需 20 毫升上述多聚(A)溶液。

进一步用上样用的缓冲液洗涤纤维素以除去没有结合的多聚(A)，再着手定量洗脱同多聚(U)-纤维素结合的多聚(A)。为了从柱中洗脱 RNA，把柱内的温度升高到 25°C ，流过 25 毫升洗脱 RNA 的缓冲液，或者同样量的 0.01M Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0)，收集每 5 毫升为一组分。测量每一洗脱组分中 A_{260} 的值。计算同多聚(U)-纤维素结合的多聚(A)光密度单位的总量。用这种方法测定的多聚(A)光密度的量即是 1 克多聚(U)-纤维素制剂所具有的比特性容量。通常用上述方法制备的 1 克多聚(U)-纤维素的容量是 5~6 光密度单位。每次重新制备多聚(U)-纤维素制剂时都要重新测定容量。

在多聚(U)-纤维素上吸附含有多聚(A)的 mRNA

总的多聚核糖体 RNA 加到多聚(U)-纤维素柱上

RNA 沉淀溶于含有 0.1M NaCl 的 0.01M Tris-HCl 缓冲液中 (pH 7.6)，RNA 的最终浓度是 $0.3 \sim 0.6$ 毫克/毫升，上到多聚(U)-纤维素的柱上，室温，流速 0.5 毫升/分。为了从 10 毫克总的多聚核糖体 RNA 中提取全部含有多聚(A)的 mRNA，用 1 克多聚(U)-纤维素就足够了。

多聚核糖体加到多聚(U)-纤维素上

根据 Schreier, Staehelin 的方法将所得到的多聚核糖体

(Schreier, Staehelin, 1973)溶解在 0.01 M Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)中,使多聚核糖体的最终浓度为 1~2 毫克/毫升。向多聚核糖体的溶液添加 0.5 M EDTA 溶液(pH 7.5)到最终浓度为 0.5%,混合液在 37°C 保温 1 分钟,然后添加 1 M NaCl 溶液到最终浓度为 0.1 M。上多聚(U)-纤维素柱之前,多聚核糖体溶液用含有 0.1 M NaCl 的 0.01 M Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)稀释 1 倍。因此把浓度为 0.5~1.0 毫克/毫升的核糖体溶液(溶剂是含有 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.25% 十二烷基硫酸钠的 0.01 M Tris-HCl 缓冲液)加到多聚(U)-纤维素上,在室温下流速不大于 0.5 毫升/分(Lindberg, Persson, 1972)。不与多聚(U)-纤维素结合的物质绝大部分从柱内流出,处在开头四个组分中(组分的体积 5 毫升)。不管是多聚核糖体总的 RNA 或者是核糖体本身上到多聚(U)-纤维素柱上后都必须用 20 毫升的上样用的缓冲液洗涤柱以除去没有结合的物质。

被吸附物质多聚(A) mRNA 的洗脱

被吸附物质——多聚(A)mRNA 的洗脱,可用洗脱用的缓冲液或者用 0.01 M Tris-HCl 缓冲液,在 25~30°C 进行,流速 0.5 毫升/分,每一组分为 5 毫升。含有多聚(A)的 mRNA 在最初 20 毫升缓冲液中就完全从柱中洗脱下来。

用多聚(U)-纤维素吸附法提取的大鼠肝脏含有多聚(A)的 mRNA,在蔗糖密度梯度中具有 mRNA 的特征性的分布:主要的物质是在 30S 到 10S 的区域内沉降,核苷酸的组成中具有高

含量的 AMP(30%), $\frac{G+C}{A+U}$ 的比值 = 0.9~1.0。

心肌 RNA 分解过程的研究

М. П. Явич

当研究生物体中各种生理和病理过程时, 研究 RNA 的分解速度是很有意义的。特别是当要了解器官代偿性生长时和组织更新时蛋白质合成调节机理时, 这些知识是极为重要的。

从 RNA 分解速度的数据能估计细胞蛋白质合成系统的稳定性, 根据 RNA 分解动力学的研究可以测量 RNA 的半寿期和代谢时间, 以及计算在单位时间内 RNA 分子的更新率。

下面将叙述心肌 RNA 分解速度研究的方法。

方法的原理

RNA 分解速度的研究是用同位素的方法。给动物注射 ^{14}C -乳清酸, 根据从 RNA 出来的放射性标记能够判断 RNA 分解的速度。RNA 的半分解时间 ($t_{1/2}$) 可用图表计算, RNA 的代谢时间和在单位时间内 RNA 分子的更新率可以用适当的公式计算。

试 剂

1 M KOH 溶液; 5% 和 10% TCA 溶液。

0.5 M 和 1 M HClO_4 溶液。

0.05 M, 0.1 M 和 3 M HCl 溶液。

乙醇, 乙醚, PPO, POPOP。

甲醇; 乙二醇, 二氧己环。

^{14}C -乳清酸。

离子交换树脂 Dowex (H^+ 型), 50×4 (200~400 目)。

研究的过程

在三天内给大鼠二次注射比强度为 60 毫居里/毫克的 ^{14}C -乳酸 (按 70 微居里对 100 克体重大鼠计算)。然后把一部分动物杀死和测定 RNA 的原始放射性。剩下的动物分为几组, 在测定 RNA 原始放射性之后经过 3 天、5 天、7 天、9 天和 11 天杀死动物。

测定 RNA 的放射性

动物斩头后立即取出心脏, 用生理盐水洗去血污。在扭力天平上称取心肌(每份 200 毫克)和测定整个心脏的重量。所有操作都在 4°C 下进行。把称好的心肌在 30 倍体积的水内用玻璃匀浆器匀浆, 在冷却的情况下进行。添加 20% 的 TCA 溶液到最终浓度为 5% 以沉淀大分子。离心后所得的沉淀, 根据 Schmidt 和 Thannhauser 的程序处理。

分级分离的过程简述如下: 用 5% TCA 溶液洗涤沉淀三次除去酸溶性物质, 然后为了除去磷脂, 用 80% 乙醇洗涤, 用热的乙醇和氯仿的混合液(3:1)洗涤, 然后用乙醇和乙醚洗涤。干燥的材料在 2 毫升 1M KOH 溶液中小心地调匀(根据 1 毫升 KOH 溶液对 100 毫克湿组织计算), 在 37°C 放置 18 小时。碱水解后的悬浮液放到冰浴中, 用 1M HClO_4 溶液中和。在冷却的情况下进一步用 1M HClO_4 溶液酸化使 DNA 沉淀。过氯酸钾与沉淀在一起, 通过离心将 RNA 从水解物中分离出来。

以这种方式所得的核苷酸溶液用来作分析。RNA 的量按 A. C. Спирин 的方法 (1958) 在分光光度计上进行测定。而 RNA 的放射性测量是用闪烁计数器在二氧己环溶剂中进行。根据这些数据计算 RNA 的比强度(脉冲/分/毫克)和总放射性(整个器官中

RNA 总含量乘平均比强度)。

从 RNA 水解物中提取尿嘧啶核苷酸

给动物注射的乳清酸约有 90% 转变为尿嘧啶核苷酸, 可用离子交换层析的方法把它从 RNA 水解物中提取出来。此法是应用 Dowex(H^+ 型)树脂。详细步骤已由 Katz 和 Comb(1963)所叙述。

向核糖核苷酸的中性溶液添加等体积 0.1M HCl 溶液到最终浓度为 0.05M, 把此溶液上到 Dowex(H^+ 型)柱上(0.9×15厘米), 此柱事先用 0.05M HCl 溶液平衡。用 5~6 毫升 0.05M HCl 溶液洗脱尿嘧啶核苷酸, 而剩下的物质弃去(检查从柱流出洗脱液的吸收是在波长 254 nm 下进行)。尿嘧啶核苷酸的量是用分光光度计在波长 257 nm 下进行测定, 而它的放射性是在二氧己环溶剂中用闪烁计数器进行测量。

测定心脏的游离核苷酸酸溶性储存库的放射性

将沉淀和洗涤大分子后所得心肌的三氯醋酸抽提液合并, 多次的与乙醚振荡除去 TCA。这些抽提液的放射性测量是在二氧己环溶剂中用闪烁计数器进行和把它换算成 100 毫克湿组织重来计算。

测定心肌半分解时间和代谢的时间

根据文献资料, RNA 的分解产物特别是嘧啶碱基, 不再被利用(Hurlbert, Potter, 1952)。在心肌内 RNA 的放射性水平高于酸溶性的游离核苷酸储存库中的 ^{14}C -活性 10~15 倍(按单位组织重量计算)。可以这样认为, RNA 的分解产物, 在 RNA 合成过程中基本上不再被利用。在我们试验中 RNA 水解产物的放射性变化的过程是同从水解产物中提取出来的尿嘧啶核苷酸放射性变

化的过程相一致的; 所以, 来自 RNA 全部水解产物的和来自尿嘧啶核苷酸的标记物的产率量是一样的。

为了估计 RNA 分解的速度, 需计算整个心脏 RNA 的放射性 (RNA 总的放射性)。应该注意到 RNA 比放射性强度随着注射同位素后时间的流逝而降低, 这种降低反映两个同时进行的相反过程: 标记 RNA 的分解和新的非标记分子的合成。当器官过度生长时 (例如, 心肌过厚) RNA 的合成比超过 RNA 的分解。因此为了判断分解的真实过程 (此分解过程与其它标记物的《稀释》作用无关), 必须注意到 RNA 总的放射性的变化。

注射同位素后 RNA 总的放射性的变化过程与时间有关, 可以用半对数座标来表示 (图 34)。为了计算出 RNA 的半分解时间 ($t_{1/2}$), 可从座标纵轴上找到相应于 RNA 起始放射性 $1/2$ 的数值, 划出水平线, 从它与放射性-时间曲线相交的交点上画一条垂直线到纵轴上。

RNA 代谢时间 (T) 和在单位时间内 RNA 分子更新或分解的百分数可按下列公式计算:

$$T = t_{1/2} (\ln 2);$$

$$\text{更新}\% = 100 \ln 2 / t_{1/2}$$

$t_{1/2}$ ——半分解的时间, 从图表测定 (见图 34)。对于心肌 RNA $t_{1/2}$ 是 7.4 昼夜; T ——10.4 昼夜, 而在一昼夜内 RNA 的更新是 9.3%。

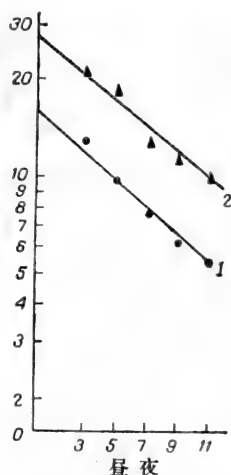


图 34 大鼠心肌 RNA 分解的动力学

1——RNA 的比强度;

2——RNA 的总放射性

纵座标——放射性, 以正个心脏的脉冲/分钟 $\times 10^4$ 表示;

横座标——注射 ^{14}C -乳清酸后的时间 (秒钟)

根据单位时间内 RNA 分解的知识与 RNA 分解的资料, 不仅可以估计出 RNA 合成的速度, 并且还可以估计出在组织内形成的 RNA 的真正的量。这在研究生长组织时 (例如心肌代偿性的增生) 有其特殊的意义。

最后应该指出, 总 RNA 分解速度的数据, 从本质上说是反映心肌核糖体分解的速度, 因为核糖体 RNA 占细胞全部 RNA 的 85%。

动物细胞质膜的提取

A. B. Пospelova

为了研究质膜的化学成分, 结构和功能必须将它提纯。

用任一方法提取亚细胞结构都包括组织匀浆与亚细胞结构的分级分离等步骤。匀浆的目的是在尽量不损害各亚细胞结构的前提下破坏细胞。亚细胞结构的分级分离是采用差速离心法, 特别是密度梯度离心法。通常利用 NaHCO_3 或者蔗糖作为分离质膜的介质, 有时添加 2 mM CaCl_2 (C. K. Давыдова, 1968)。为了进一步纯化质膜可利用蔗糖溶液梯度超离心法, 梯度的范围是 $1.22 \sim 1.16$ (Emmelot et al., 1964)。

根据产量和纯度对大规模提取质膜的三种方法作了比较 (Charles, John, 1972): Neville 法 (1960), 该法是利用 1 mM (低渗) 的 NaHCO_3 溶液来匀浆和洗涤质膜。Реза 法的特点是添加 0.5 mM CaCl_2 到 1 mM NaHCO_3 溶液中去, 并且为了匀浆和洗涤需消耗大量体积的溶液。最后一个方法, 该法在匀浆和洗涤时是应用 0.25 M 蔗糖、 0.5 mM CaCl_2 和 5 mM Tris 溶液 (Takeuchi, Terayama, 1965)。从大鼠肝脏提取质膜。在具有聚四氟乙烯研杵的匀浆器中进行匀浆, 所有匀浆通过四层纱布过滤, 在蔗

糖密度梯度(1.22, 1.18, 1.16)溶液中, 61000g离心 2 小时。纯化的膜最后用水洗涤二次。根据 Neville 方法提取的肝脏细胞的质膜是很纯的。按 Рея 的方法提取所得的膜产量最高。

我们象许多其他研究者一样, 利用 Neville 改良方法从大鼠肝脏提取质膜。现将该法叙述于下。

试 剂

1mM NaHCO_3 溶液, 酸化到 pH7.5。

密度为 1.34, 1.18, 1.16 的蔗糖溶液。450 克蔗糖在水浴上加热, 不断搅拌下溶于 0.5 升水中。冷却后溶液慢慢地用水稀释到相应的密度——1.34, 1.18 和 1.16(用比重计测量)。

材料的制备

动物断头杀死后, 剖开腹腔, 在原位切开门静脉, 插入套管, 通过套管用冷的 1mM NaHCO_3 溶液进行肝脏灌注, 一直到流出的液体无血色为止。然后从腹腔中取出肝脏, 小心地用滤纸吸干, 除去结缔组织, 称重, 用小剪刀剪碎。所有上述手续必须在冷室内($2\sim 4^\circ\text{C}$)进行。

提 取 过 程

5 克肝脏和 25 毫升 1mM NaHCO_3 溶液(pH7.5)在 Potter-Elvehjem 玻璃匀浆器中用手把聚四氟乙烯研杵从上到下移动 35~40 次。匀浆以后在相差显微镜下检查细胞破坏的完全程度。匀浆中未破坏的细胞不应超过 5% 的。所得的匀浆用 500 毫升同样的 NaHCO_3 溶液稀释, 振荡 2 分钟。肝脏的稀释匀浆通过 6 层纱布过滤, 1200g 离心 10 分钟。弃去上清液, 将上面玫瑰色沉淀层与褐色的下层分开。弃去褐色沉淀。将所得的玫瑰色膜沉淀

悬浮在用来进行匀浆的介质中，在同一条件下离心。这样的操作重复三次。

将膜沉淀悬浮在水中，倒入吊篮转头的离心管中（制备离心机）。向 1.2 毫升悬浮液在搅拌下逐滴加入密度为 1.34 的 2.1 毫升蔗糖溶液。得到混合液的密度是 1.20。把 1 毫升密度为 1.18 的蔗糖溶液小心地铺层到这个混合液上面，然后再铺上 1 毫升密度为 1.16 的蔗糖溶液。在 100000g 离心 75 分钟。

离心后出现明显的二层，位于蔗糖密度梯度 1.20~1.18 和 1.18~1.16 处。在蔗糖密度 1.18~1.16 之间的区带分离出质膜。细胞质网膜和线粒体碎片集中在蔗糖密度 1.20~1.18 的区域内。在液体的表面通常生成一层脂肪膜，在离心管的底部沉积有核和线粒体的碎片以及未破坏的细胞。

可在离心管质膜层相同高度的位置或者在管子底部穿孔，从离心管中收集质膜层。如果不采用离心管的穿刺法，那么可把原生质膜层吸出，吸时应很小心（首先去掉脂肪薄膜）。所得的质膜制剂用蒸馏水洗涤二次。

质膜制剂的纯度可用电子显微镜和根据酶—标记的活性（ATP 酶和 5'-核苷酸酶）来检验，被提取出来的质膜是否被微粒体污染，可用是否存在有葡萄糖-6-磷酸酶来检查。是否被线粒体污染可用是否具有琥珀酸酶来检验。制剂被溶酶体污染情况可测定酸性磷酸脂酶的活性水平来衡量。有否被核的碎片污染，可根据 DNA 的存在来决定。

细胞质网膜的提取法

А. Д. Златопольский

在电子显微镜下研究能分泌大量蛋白质的组织切片时，发现

有丰富的细胞内膜结构——细胞质网膜（内质网）*。由于细胞质网膜可形成许多连续的小腔并把细胞分割成许多小室。经常看到细胞质网膜同外核膜和同线粒体膜相联接。据推测，核膜、细胞质网膜和原生质膜一起形成一个统一的细胞网膜。

细胞质网膜是有形态上显著不同的二种类型组成的：颗粒状细胞质网膜或者叫粗糙的膜，在它们的表面覆盖着核糖体；无颗粒细胞质网膜或者叫光滑的膜，在它们的表面不覆盖着核糖体。通常，没有核糖体的膜与有核糖体包裹的膜相间存在。

颗粒状细胞质网膜和无颗粒细胞质网膜在结构和化学组成上是相似的。二种类型的膜具有某些共同的功能。已知，许多酶无论在颗粒状细胞质网膜或者无颗粒细胞质网膜中都有。通过细胞质网膜输送被细胞分泌的蛋白质。每一种类型的膜也有其本身特有的功能：在颗粒状细胞质网膜上进行着蛋白质的合成和被合成的蛋白质的酶促修饰。磷脂的合成和具有解毒作用的酶的存在是无颗粒细胞质网膜所具有的特征。

亚细胞结构分级分离方法的改进是进一步研究细胞质网膜功能所必须的。

提取细胞质网膜的原理

细胞的破坏会引起膜的碎裂并生成大小不同和浮力密度不同的许多小泡状物（vesicle）。为了提取和分离细胞质网膜应用差速和梯度离心或二者结合。差速离心的方法可将膜小泡与其他在重量上和沉降速度上有差异的亚细胞结构分开，用这个方法可以得到细胞膜的总制剂（微粒体组分），此制剂含有无颗粒细胞质网膜和颗粒状细胞质网膜。密度梯度离心法可以根据密度的不同来分开各个结构，并应用来制备无颗粒细胞质网膜和颗粒状细胞

* 细胞结构的命名是依照国际细胞学命名法。

质网膜。把这些方法结合可以增加制剂的纯度和膜物质的产量。

对提取细胞质网膜方法所提出的要求

由于所有提取细胞质网膜的方法需作进一步的改进，所以我们提出下面这些要求，这些要求是在选择膜的分离条件时所应遵守的。

1. 成分(蛋白质, RNA 和脂肪的比例)的恒定和膜上各种酶的比活力的恒定。

2. 制剂的纯度——没有沉降系数和(或)浮力密度上相近似的结构;通常这是指线粒体, 溶酶体, 过氧化物酶体, 游离多聚核糖体, 细胞质可溶性蛋白, 在某些情况下可能同样被核的核蛋白污染。

3. 膜产量足够高

现有的方法有可能从沉淀线粒体以后的离心液中得到颗粒状细胞质网膜和无颗粒细胞质网膜制剂。这些制剂不含有其他亚细胞结构的杂质。迅速沉降的颗粒状细胞质网膜和无颗粒细胞质网膜含有线粒体。应该指出, 迅速沉降和缓慢沉降的两类细胞质网膜看来有质上的区别。

下面叙述了从肝脏细胞制备细胞质网膜的方法, 这些方法(有时作某些改变)也用来由动物的其他器官制备细胞质网膜。

不含其他亚细胞结构杂质的颗粒状细胞质网膜 和无颗粒细胞质网膜的制备法

溶 液

25mM Tris-HCl 溶液 (pH_{20°} 7.6), 50 mM KCl, 5 mM

MgCl₂, 0.25M 蔗糖(缩写成 TKMS)。

25 mM Tris-HCl 溶液 (pH_{20°} 7.6)。50 mM KCl, 5 mM MgCl₂(以后将缩写成 TKM 溶液)。

1.3M 和 2M 蔗糖溶液, 配制在 TKM 溶液内。

制备除去线粒体后的上清液

动物断头杀死后迅速取出肝脏, 用冰蒸馏水洗一下, 放到冷的 TKMS 溶液中。所有以下操作都在 2~3°C 进行。肝脏用 TKMS 溶液洗去血污, 通过压榨机压碎(压榨机孔的直径是 1 毫米)或者用小剪刀剪碎。称重后将肝脏糊和 TKMS 溶液一起倒到 Potter-Elvehjem 匀浆器中, 肝脏糊和 TKMS 溶液的体积比是 1:3。进行匀浆时研杵的转速是 1500 转/分, 往返十次。匀浆液通过 2 层纱布过滤后在 17000g 离心 10 分钟。除去线粒体后的上清液通过四层纱布过滤。

从除去线粒体后的上清液提取无颗粒细胞质网

膜和颗粒状细胞质网膜

在角转头 50Ti(超离心机«Spinco»)的离心管中预先加入 3.5 毫升 2M 蔗糖溶液, 3.5 毫升 1.3M 蔗糖溶液和 5.5 毫升除去线粒体后的上清液。在 160000g (相当于 45000 转/分) 离心 14 小时。在 1.3M 蔗糖溶液和除去线粒体后的上清液液层的界面上能够看到无颗粒膜的几个狭窄的区带, 在 1.3 和 2M 二个蔗糖溶液层间的界面上可见到颗粒状膜, 其分布如同无颗粒状膜那样是呈一组不连续的区带, 也就是说这些区带具有不同的浮力密度。在沉淀中为游离的多聚核糖体。用带有长针头的针筒抽出膜, 用 TKM 溶液稀释 3~5 倍, 在角转头 90000g (相当于 28000 转/分) 离心 60 分钟。膜的沉淀物用带有橡皮球的吸管吸出, 把其悬浮在

TKMS 溶液中。通常把膜以沉淀状态在冰中保存不能超过 2 昼夜。

应用上述方法膜的损失是 70~80%。这个提取细胞质网膜的方法在研究多聚核糖体代谢时被我们曾加以应用 (А. Д. Златопольский и др., 1973)。

这个方法可以作以下的改进:

1. 如果不要与膜结合的核糖体和颗粒状细胞质网膜完全分开, 离心的时间可以缩短。例如, 在 50Ti 转头 45000 转/分 (160000g) 离心 3 小时对于分离颗粒状细胞质网和无颗粒细胞质网就足够了。此时颗粒状细胞质网膜和无颗粒细胞质网膜将是二个宽的区带。

2. 在不要求把颗粒状细胞质网膜和游离核糖体分开的情况下, 不必要在离心管的底部铺上一层 2M 的蔗糖溶液。此时游离多聚核糖体和颗粒状细胞质网膜是在沉淀中。

3. 为了制备无颗粒细胞质网膜的纯制剂, 建议利用它们能在蔗糖溶液中浮起的特性。蔗糖溶液比无颗粒细胞质网密度大而比颗粒状细胞质网的密度小。为此向 1.47 毫升的 2M 蔗糖溶液添加 1 毫升除去线粒体后的上清液 (蔗糖的最终浓度为 1.3M), 将混合物铺层到 2M 蔗糖溶液上。上面必须加入小量体积的 TKMS 溶液。

4. 蔗糖分段梯度中的中间层其浓度范围定为 1.2~1.4 M (一般是 1.3 M)。当必须制备颗粒状细胞质网膜而又要很好地除去无颗粒细胞质网膜时, 可提高中间层的蔗糖浓度。

如果必须制备尽可能纯的无颗粒细胞质网膜的制剂, 那么中间层蔗糖的浓度应降低。

快速沉降的细胞质网膜的提取方法

提取细胞质网膜的标准步骤, 是制备除去线粒体后的上清液

(10000~20000g, 10~15 分钟) 和接着在蔗糖分段密度梯度内分级分离颗粒状细胞质网和无颗粒细胞质网。但是随着核和线粒体的除去细胞质网膜也损失了 70~80% (根据葡萄糖-6-磷酸酶活性和 RNA 的含量测定), 并且在 600g 约有 50% 的膜被沉淀, 在 6000g 有 10% 的膜被沉淀 (Lewis, Tata, 1973)。用电子显微镜研究这个快速沉降类型的颗粒状细胞质网膜时, 看上去这膜象是一束椭圆形的小泡, 通常大部分同线粒体相接触。这些膜的外形与接近核处的细胞切片上所看到颗粒状细胞质网膜的外形区别不大。这些观察证明了这些膜与从除去线粒体后的上清液所得的膜有质上的差异。因此我们用来提取这些膜的方法, 看来, 需要作进一步的完善。

25 mM 醋酸镁; 0.35M 蔗糖溶液, pH₂₀ 7.6 (缩写为 MS 溶液)。

沉淀快速沉降的细胞质网膜

肝脏在 2.5 倍体积的 MS 溶液中用 Potter-Elvehjem 匀浆器进行匀浆, 研杵的转速是 800 转/分, 往返 11 次。匀浆液通过二层纱布过滤, 在 640g 离心 10 分钟。红血球, 细胞核, 线粒体和快速沉降的细胞质网膜下降到沉淀中。酸性磷酸化酶和过氧化氢酶的活性在这个工作中没有进行测定, 所以不清楚在那个组分中有溶酶体和过氧化物酶体。

除去快速细胞质网膜中的红血球和核

沉淀悬浮在 5 倍体积 MS 溶液中。每份 12.5 毫升的悬浮液溶于 7.5 毫升 MS 溶液中, 添加 6 毫升无离子水。离心管的底部放置 18 毫升 MS 溶液, 而上面铺上一层被稀释的悬浮液, 在 360g 离心 10 分钟。此时红血球和核定量地被沉淀。

从快速沉降的细胞质网膜制备颗粒状细胞 质网膜和无颗粒细胞质网膜

上清液在体积为 50 毫升的离心杯中, 15000g 离心 15 分钟, 所得沉淀悬浮在 5~10 毫升 MS 溶液中, 在 6.5 毫升 1.3M 蔗糖溶液上面铺上一层 12.5 毫升悬浮液, 在 105000g 离心 2 小时 30 分钟。

由于这样处理的结果, 在沉淀中有快速沉降的颗粒状细胞质网组分。而中间层为无颗粒细胞质网的组分。

从沉淀核后的上清液中制备细胞质网膜

可用一般的方法进行提取: 640g 离心所得的液体再在 6000g 离心(二次)除去线粒体; 将除去线粒体后的上清液铺层到蔗糖分段梯度上, 象上述的方法一样进行颗粒状细胞质网膜和无颗粒的细胞质网膜的分离。

这个方法可以得到在质上不同的二种类型的细胞质网膜, 每一种类型都含有无颗粒细胞质网膜和颗粒细胞质网膜。使用这个方法细胞质网膜的损失是 30~40%。

Adelman 和其同事 (1973) 提出了一个制备膜的方法, 该法可以将除去线粒体后的上清液中的膜的产量提高到 50%。用不含离子的浓蔗糖溶液来进行提取, 再将线粒体沉淀重复悬浮二次后, 再将所得悬浮液离心的方法可以做到这一点。但是这个方法也不是没有缺点的。特别是该法制备除去线粒体后的上清液的操作时间太长, 不可能得到大量的膜, 并且用这个方法所提取到的膜会被溶酶体和过氧化物酶体的酶所污染。

鼠的唾液腺神经组织生长因子的提取

Н. А. Кузьмичева

神经组织生长因子(ФРНТ),首先在鼠的肉瘤 180 和 37 中发现,它能增强交感和胚胎感觉神经细胞的生长和分化。以后又在蛇毒和鼠的唾液腺中发现 ФРНТ,并且其量比肉瘤中大得多。已证明它是蛋白质性质的活性物质(Cohen, 1960)。

从出生的第一天开始给动物注射 ФРНТ,会引起交感神经系统的亢进。但是出生后注射 ФРНТ 不影响感觉神经结,因为只是在胚胎时期感觉细胞对是 ФРНТ 敏感的。

对 ФРНТ 专一的抗体引起交感神经节的破坏。

当添加 ФРНТ 到培养交感或者胚胎感觉神经节的培养基中,引起它们纤维的辐射生长。在培养基中神经节的周围纤维的轮圈可以有不同的大小和密度,这是由于 ФРНТ 的浓度不同而决定的。这个现象可用来测定被研究的液体中 ФРНТ 的含量。

测定 ФРНТ 的活性

试剂和材料:凝血酶,培养基 No.199,公鸡的血浆。

在提取 ФРНТ 过程中用 7~9 天鸡胚感觉神经节培养物按照 Levi-Montalcini, Hamburger (1953)的方法测定 ФРНТ 的生物活性。

将鸡胚感觉神经节放到一滴溶液内,此溶液含有 0.025 毫升公鸡血浆,0.025 毫升凝血酶溶液(溶于 199 培养基中,0.05 毫克/毫升),0.025 毫升待测液。样品在 37°C 保温 18 小时,如在待测液中存在 ФРНТ,则在保温后能够观察到从神经节长出来的轴突辐射生长。所形成轮圈的密度和宽度与所存在的 ФРНТ 的量成正

比,按照 0 到 +4 的 5 个等级来评定。 Φ PHT 的生物单位 (1 个生物单位)定为在 1 毫升培养基中含有这样的 Φ PHT 量,这个量在 18 小时保温时能引起感觉神经节 +3 的反应。

Φ PHT 的提取

试剂: 按 Lowry 方法测定蛋白质用的溶液; 硫酸铵; 氯化钙, 磷酸氢二钠; Sephadex G-100 和 G-150。

作为提取 Φ PHT 的材料是用鼠的唾液腺,因为在此腺体中含有这个活性物质较多。下面所述的提取 Φ PHT 的方法是 Varon 和其同事(1967)所采用方法的改良法。

将 20 克重的雄性成年小鼠的颌下唾液腺在 330 毫升冷的蒸馏水内匀浆。按 Lowry 的方法测定匀浆中蛋白质的量是 2400 毫克(见表 28)。匀浆在 18000g 离心 30 分钟,弃去沉淀。

从含有约 1500 毫克总蛋白质的上清液中用饱和硫酸铵溶液(用氨水调节到 pH 7.0)沉淀蛋白质的活性组分。活性蛋白质在 0.5~0.75 硫酸铵饱和度时被沉淀下来。在上清液中建立 0.5 硫酸铵饱和度后(按 10 毫升饱和硫酸铵溶液对 10 毫升离心液计算),混合液放在冰库内 1 小时。然后离心 30 分钟,弃去沉淀。向上清液重新添加硫酸铵溶液到 0.75 饱和度(10 毫升离心液添加 10 毫升饱和硫酸铵)。混合液在冰库内放置 3 小时,然后离心。在沉淀中约含有 950 毫克蛋白质,此沉淀具有生物活性。将沉淀分为二个等量的部分,各溶于 10 毫升水内,用氨水调 pH 至 7.0 上 Sephadex G-100 柱(柱长 125 厘米,直径 4 厘米)。用 pH 7.0 的水平衡和洗涤柱。流速是 40~50 毫升/小时。在 C Φ -4 分光光度计波长 280 nm 测定溶液的光密度。在生物学上有活性的蛋白质是在洗脱曲线(G-100 组分)的第一峰中。

二个 G-100 组分中的每一个组分都含有约 85 毫克蛋白质,让

他们各自过羟基磷灰石的柱。羟基磷灰石是磷酸钙盐— $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，它是氯化钙和磷酸氢二钠混合时所析出的沉淀。为了装填一根柱所需的羟基磷灰石的量可取 300 毫升 0.25 *M* 氯化钙溶液和 300 毫升 0.25 *M* 磷酸氢二钠溶液混和。生成的沉淀用 pH 7.0 的水洗涤，接着倾析，然后把它装到柱上（柱长 20 厘米，直径 2 厘米）。磷酸钙盐的结晶呈星状，由于它有巨大的表面，所以能很好的吸附蛋白质。

表 28 从小鼠唾液腺提取 ΦPHT

组 分	蛋白质的总量 (毫克)	比 活 力		ΦPHT 总量, 生物单位 $\times 10^{-6}$
		生物单位/毫 克蛋白质	毫克蛋白质/ 生物单位	
匀 浆	2400	2000	0.500	4.8
上清液	1560	2756	0.366	4.3
0.7 饱和度的硫酸 铵沉淀组分	948	3375	0.300	3.2
G-100 组分	174	16667	0.060	2.9
羟基磷灰石组分	93	26881	0.037	2.5
G-150 组分	42	52381	0.019	2.2

把 G-100 组分 150~200 毫升上到羟基磷灰石的柱上。然后按次用 0.01*M*, 0.05*M* 和 0.1*M* 磷酸二氢钠(pH7)的溶液进行洗脱。溶液从柱中流出的速度是 60~70 毫升/小时。在生物学上有活性的蛋白质组分, 可用 0.05 磷酸二氢钠溶液洗脱下来。

从二根羟基磷灰石柱洗脱下有活性的组分合并。组分中的蛋白质用 0.7 饱和度的硫酸铵溶液(pH7)沉淀。

在硫酸铵溶液中的制剂可在冰库内一直保存到最后阶段用 Sephadex G-150 凝胶过滤。为此, 将混合液离心, 沉淀溶解在 3 毫升水内(pH7.0), 上到 Sephadex G-150 柱上(柱的长 95 厘米,

直径 2.5 厘米)。上柱的蛋白质量是 90 毫克。用 pH7 的水平衡和洗涤柱。流速是 20~25 毫升/小时。具有生物活性的蛋白质组分是在洗脱曲线(G-150 组分)的第一峰位。这个组分的蛋白质(将近 42 毫克)冷冻干燥后保存在冰箱中。

从表 28 所示的数据可见,最后的纯化产物的比活力(G-150 组分)大于 52000 生物单位/1 毫克蛋白质。因此,一个生物学单位相当于 0.02 微克蛋白质。 Φ PHT 的比生物活力的值与另外一些作者所得的结果相符合(Varon et al., 1967)。在组分 G-150 中的活性蛋白质其纯化程度比唾液腺的匀浆液提高了 25~30 倍。

所得蛋白质在超离心沉降时得到一个不对称的峰。占全部物质 85~90% 的主要组分的沉降系数是 7.1S。

用上述方法制备的 Φ PHT 制剂有很高的生物活性,并对小鼠没有毒性。

用微孔滤膜分级分离标记的细胞大分子的方法

О. Ю. Абакумова

放射性前体的掺入作用被广泛的应用在蛋白质、核酸、脂肪和动物细胞的其他大分子的合成研究中。通常要求用一定类型的大分子的专一前体,标记物掺入到这些大分子中去的测量可归结为大分子的提取和测其比放射性。但是为了研究物质代谢的不同方面,特别当应用致癌或者化疗的物质时,或是应利用可掺入到所有细胞大分子中去的非专一的放射性前体,或是应用在烷基或者在氨甲酰基中含有 ^{14}C 的化合物,和能使所有细胞的大分子进行烷化作用或者进行氨甲酰基化作用的物质。当测定这些物质掺入到大分子的情况时,必须提取和纯化每一种被研究的分子的类型(RNA, DNA, 脂肪, 蛋白质)。可利用微孔滤膜分级分离细胞的大

分子。Schmidt 和 Thannhauser 和 Schneider 的经典方法是这个方法的基础,但把这个经典方法作了一些改良,为的是使某一类型的大分子的最后所研究的组分被细胞的其他物质的污染减少到最低的限度。

试 剂

5%, 10%, 20% 和 50% TCA 溶液。

70% 乙醇; 0.5M NaOH 溶液; 20% Triton X-100; 乙醚(麻醉用)。

甲苯闪烁液; 3.5 克 PPO 和 0.1 克 POPOP 溶于 1 升甲苯中。

溶液 A: 0.25M 蔗糖, 5mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 25mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)。

溶液 B: 1mM $MgCl_2$, 10mM 磷酸钾缓冲液(pH7.4)。

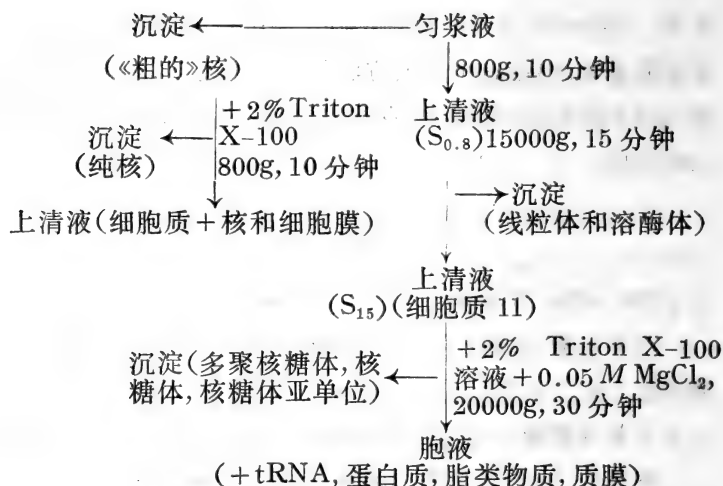
Брея 溶液: 400 毫升二氧己环, 100 毫升甲醇(或者乙醇), 10 毫升乙二醇, 30 克升华结晶的萘, 2 克 PPO 和 0.2 克 POPOP。

膜(Сынпор)的或者捷克制的微孔滤膜 AufS (No.3), 孔径 1.5 微米。

匀浆物的制备和它的分级分离

被研究的组织或者器官加 3 倍体积的溶液 A (器官和组织的重量比, 克/毫升)在冷处用带有聚四氟乙烯研杵的匀浆器中进行匀浆。匀浆物按下面图解进行分级分离。

在分级分离时应准确的称重器官和组织, 并测量匀浆液和每一组分的体积, 这对于下一步将大分子的放射性换算成每 1 克湿重或每 1 毫克组织的 DNA 是必需的。将核的沉淀和线粒体的沉淀悬浮在溶液 A 中。多聚核糖体的沉淀悬浮在冰水内和对溶液 B 透析 2~12 小时。



从每一组分中挑选出 12 个试样。每一个试样为 0.1 毫升, 把它们放到冰浴中, 添加 2 毫升冰水和 2 毫升冷的 TCA, 在 0°C 放置 30 分钟。然后把三个试样用滤膜获得沉淀, 沉淀用 5% TCA 溶液洗涤二次, 或者用乙醇干燥, 或者在红外线灯下在 50~60°C 干燥。在滤膜上所得的沉淀含有全部标记的大分子 (RNA, DNA, 脂类物质, 蛋白质)。

剩下的 9 个试样在 3000g 离心 10 分钟, 收集上清液用来测量酸溶性组分的放射性。向沉淀添加 3 毫升 70% 乙醇和在室温中放置 30 分钟。所得的沉淀二次悬浮在乙醇中, 接着在 40°C 保温 10 分钟。把 9 个试样中的 3 个放到滤膜上进行干燥。沉淀中含有 RNA、DNA 和蛋白质, 而脂类物质组分在用乙醇处理时已除去。

把剩下的 6 个试样在 3000g 离心 5 分钟除去乙醇, 向每一个沉淀添加 2 毫升 0.5M NaOH 溶液。试样在恒温器中放 37°C 40 分钟, 在这段时间内试样中所有的 RNA (只有 RNA) 被水解和转变为酸溶性的状态。水解结束后将试样放到冰浴中, 向它们添加 0.6 毫升 50% TCA 溶液。在冰浴中保持 30 分钟后, 6 个试样中的 3

个在滤膜上沉淀，用 5% TCA 溶液洗涤二次，将滤膜干燥。在沉淀中有蛋白质和 DNA。

剩下的三个试样在 3~4000g 离心 5 分钟；倒出上清液，向沉淀添加 2 毫升 5% TCA 溶液，在 90°C 加热 10 分钟，使 DNA 水解。然后将试样冷却和在滤膜上沉淀，用 5% TCA 溶液洗涤二次。在沉淀中只留下蛋白质。

经透析后测定多聚核糖体溶液内物质的浓度和制剂的纯度 (B. Л. Лейтин, М. И. Лерман, 1969)，然后选取 6 个试样，每个试样为 0.1~0.5 毫升，含有 1~1.5 毫克多聚核糖体。向 3 个试样添加 3 毫升 10% TCA 溶液，放到冰浴中 30 分钟和在滤膜上沉淀，而向剩下的 3 个试样添加 2 毫升 0.5M NaOH 溶液以水解 RNA (见上面)。RNA 水解后在滤膜上沉淀核糖体的蛋白质。根据水解前后沉淀的放射性差异测定核糖体 RNA 放射性值。

所得沉淀的放射性可在闪烁计数器上在甲苯闪烁体中测量。酸溶性组分的放射性是在用乙醚除去组分中的 TCA 后再进行测定的。用 Брея 溶液作为闪烁体。为了计算各种类型大分子的放射性可应用下列的推理过程。

如果以 A 代表在滤膜上所有大分子的放射性和以 a_1 代表除去脂肪以后过滤膜上的放射性，那么 $(A - a_1)$ = 脂类物质的总放射性。

如果以 a_2 代表除去 RNA 后滤膜的放射性，那么 $(a_1 - a_2)$ = RNA 的放射性。

如果以 a_3 代表除去 DNA 后滤膜上的放射性——相应于蛋白质的放射性，那么 $(a_2 - a_3)$ = DNA 的放射性。

按 Blobel, Potter 改良的 Fleck, Munro 法 (М. Г. Трудногбова, 见第 296 页) 测定匀浆物中各个组分的 RNA 和 DNA 含量，按 Lowry 的方法测定蛋白质的量。计算放射性的量 (以每毫

表 29 当用 10% 和 20% 的 TCA 溶液沉淀时由小鼠不同组织的各个组分中能用乙醇抽提出的 RNA 量
(以 RNA 总的标记的百分数来表示)

组 织	匀浆液的组分	沉淀时可用乙醇抽提出的 RNA(%) 的百分浓度	
		10% TCA 溶液	20% TCA 溶液
小鼠肝脏	匀浆物	26	21
	S _{0.8}	27	29
	S ₁₅	23	7
	线粒体	20	9
	核	14	3
肝癌 22A	匀浆物	20	11
	S _{0.8}	37	42
	S ₁₅	37	33
	线粒体	47	32
	核	0	0
浆细胞癌 MOPC-21	匀浆	24	3
	S _{0.8}	18	0
	线粒体	28	29
小鼠脾脏	匀浆物	9	10
小鼠肾脏	匀浆物	32	9

克组织的 DNA 每分钟的脉冲数来表示)。同样计算 RNA、DNA 和蛋白质的比放射性，也是以各自的大分子每毫克每分钟的脉冲数来表示。

上面介绍的测定细胞大分子的放射性的方法有一个不足之处：当用乙醇抽提脂类物质时，部分 RNA 与它一起被提取出来 (Hallinan et al., 1963)。虽然 Kennell (1970)断言，当用 10%

或者更高浓度的 TCA 沉淀大鼠肝脏匀浆物的酸溶性组分时 RNA 损失很少或者没有损失,但我们所得的数据(如表 29 所示)却证明当用 10% 或者 20% TCA 溶液沉淀时,用乙醇可从不同组织和亚细胞组分中抽提出不同程度的 RNA。因此,在每一具体的情况下必须测定被乙醇抽提的 RNA 的量,而作相应的修正。为了进行这样的测定,给动物注射标记的 RNA 前体 (^{14}C -乳清酸或者 ^{14}C -尿嘧啶)后 20~24 小时,然后按上面所建议的流程对组织和器官进行处理。测定用乙醇抽提前后的 RNA 的放射性并计算与脂类物质一起抽提出来的 RNA 的百分比。如果不可能进行这样的修正,那么必须将 RNA 组分和脂类物质组分的放射性合并,而且只能测定它们的总放射性。

放射自显影方法

И. Д. Беляева

放射自显影方法是一种记录放射性的方法,光化学反应是这个方法的基础。最近在生物化学研究中放射自显影越来越成为对其它放射性检测法的当然补充法。这可用下列事实来解释:第一,用放射自显影方法能够准确定位,放射性同位素标记的前体掺入到某一组织的什么成分中,可以观察组织系统内部标记物的位移;某些同位素有可能定出代谢产物掺入到细胞的各个成分(核或者细胞质,核仁,各个染色体甚至染色体一定的部位)中的确切位置。第二,用这个方法有可能记录少量放射性元素的掺入,这个量是用一般物理仪器所不能检出的。第三,同位素自显影有可能发现标记前体进入到只有用显微镜才能观看的物体上去的掺入作用并比较这些掺入的强度。

应用特殊的照相乳胶(这种乳胶称为核乳胶),它不同于一般的

照相乳胶,具有很小的溴化银颗粒,并且有极大的明胶饱和密度),放射自显影研究法可以记录注入到组织和细胞中的放射性同位素的衰变。细胞和组织与核乳胶接触(曝光)时,细胞内的放射性元素象光线一样,能引起覆盖在细胞表面的乳胶发生光化学反应。

这个反应的实质为:同位素的 α -或者 β -粒子破坏了乳胶溴化银晶体内的静电平衡,因而在乳胶溴化银的表面就积累起银离子,这些银离子能将还原性银转变为银原子。在曝光时所生成的这些大量金属银称为潜影。乳胶显影的过程中在潜影(显影中心)区域内发生了大量银离子快速的还原,由此生成的金属银的颗粒其大小为零点几微米到1微米,在光学显微镜下可以清晰地看到呈黑色的颗粒。

放射自显影的研究中使用的主要是具有 β -射线(电子束)的同位素,例如碳(^{14}C),氚(^3H),磷(^{32}P)和硫(^{35}S)。当用这些同位素工作时必须考虑它们的半衰期的长短和 β -粒子的能量。 ^{14}C 的半衰期是5700年, ^3H —12.4年, ^{35}S —87.1天和 ^{32}P —14.3天。由于 ^{14}C 和 ^3H 有很长的半衰期,因此用这些同位素工作是很方便的,因为在很长的时间内能使放射性维持在几乎恒定的水平。

β -粒子的能量决定它们在核乳胶内行程的长度,也决定了它的分辨率;行程越短,这个方法的分辨率越高。还原性银粒的线性分布(每个 β -粒子在乳胶中所呈的行程)的总和称为径迹(track)。上述的同位素中 ^{32}P β -粒子具有最大的能量,在核乳胶中这些 β -粒子分布在几个毫米的距离内。 ^{35}S 和 ^{14}C 的 β -粒子具有比较小的能量,在乳胶中通过的距离在20微米左右。氚的 β -粒子具有最低的能量,这种粒子在乳胶中分布距离是1微米,它们的一个径迹可能是代表金属银的一个微粒。

^{14}C 和 ^3H 有很长的半衰期, ^3H 有高的分辨率,由于碳和氢是所有有机化合物的组成成分,(用这些元素的同位素可以标记大量

的代谢物), 或由于这二种同位素在应用上十分方便, 因此经常用它们作放射自显影。

带有放射性同位素的组织和细胞标本, 用覆盖于其表面的乳胶以还原性银微粒加以记录的方法称为组织放射自显影或简称自显影。

获得自显影的步骤

第 I 阶段。首先将含有放射性同位素的代谢物引入有机体或者培养基中, 追踪放射性同位素掺入到一定细胞或者组织结构的组分中去的过程。最好这个代谢产物是很专一的前体, 被引入的前体的比放射性是高的, 而引入的放射性剂量并不大。低剂量放射性的记录完全是可能的, 因为在长时间的曝光后, 由同位素发射的辐射脉冲可得到积累。

第 II 阶段。同位素掺入后要经过一定的时间后(时间长短决定于所研究的任务), 才能将组织块或者细胞悬浮液涂片固定。经常应用 Carnoy 氏液作为组织块的固定剂(该液的成分为酒精: 氯仿: 冰醋酸——6:3:1; 固定时间 2~3 小时), 而对于细胞悬浮液涂片的固定是应用冰醋酸同酒精的混合液(3:1; 10~15 分钟)。组织块用石蜡包埋然后进行切片, 切片的厚度是 5~7 微米。

第 III 阶段。这个阶段是制备覆盖核乳胶的标本。组织切片用通常的方法粘贴到载片玻璃上, 把它浸到 2~3 份甲苯或二甲苯或苯的任一溶剂中以彻底除去石蜡。此后样品用递减浓度的酒精脱水, 用蒸馏水冲洗几次, 干燥。乳胶的覆盖工作应在干燥后立即进行(不要放置 1 天以上), 因为除去石蜡后的切片在空气中易发生裂纹。

第 IV 阶段。所有以下的步骤(即用核乳胶覆盖样品, 样品的显影和定影)应在照相室内用有黄-绿滤光片 (No. 117 或者 118) 的灯下进行, 并且离开灯光尽可能远些。

目前为了使放射自显影后能用光学显微镜对样品进行检查,可使用两种核乳胶。M型乳胶是微粒型乳胶,而P型乳胶具有较大的颗粒,P型的乳胶还原性银的颗粒大小能够达到1微米。这二种乳胶中选择那一种为宜决定于研究的任务。如果必须弄清楚标记的前体掺入到细胞的各个结构组分中的过程,那么,当然最好应用M型乳胶。

加乳胶到样品上的方法是多种多样的,但是最简单和快速的方法是把样品浸入到熔化的乳胶中。

在烧杯内熔化乳胶,烧杯应浸入到恒温水浴中($37\sim 38^{\circ}\text{C}$)。乳胶加热不应超过 40°C ,因为这会大大增加底色——没有掺入的还原性放射性同位素银颗粒的量。用加热到上述同样温度的蒸馏水稀释熔化了的乳胶,通常按1:1进行稀释。将样品浸入乳胶中,取出让乳胶从样品中稍微流下,擦干玻璃片的反面,将它水平放置,使其干燥。在室温下放置几小时($3\sim 8$ 小时)使乳胶变干。为了曝光,把样品用黑纸包裹后放在一个特制的箱子内,用黑纸包裹的样品可以从暗室内拿出。通常在 4°C 让样品曝光(放在冰箱下面的架子上)。曝光的时间一方面依赖于所掺入前体的比放射性强度和注入的放射性剂量,另一方面依赖于乳胶的灵敏度,每批乳胶的灵敏度是不同的,所以每批乳胶的最适曝光时间都应通过实验来确定。测定时用乳胶及覆盖几个额外的样品,预先和其他样品分开把它们单独显影。实际上曝光的时间根据不同情况可以从几天到几个月。

第V阶段。曝光结束后样品在二氨酚显影剂或者甲胺酚-苯二酚显影剂中显影。甲胺酚-苯二酚显影剂的组成成分:甲胺酚2克,无水硫酸钠75克(如为结晶硫酸钠150克),苯二酚8克,无水碳酸钠40克(如为结晶碳酸钠110克),溴化钾5克,溶于1升水中。将上述物质顺次溶解在 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ 的热蒸馏水中。把配好的

碱性溶液保存在具有磨砂塞的玻璃瓶中,放置在冰箱内,使用前用蒸馏水按 1:2 稀释。显影后的标本用水稍微漂洗一下,在 30% 硫代硫酸钠溶液中定影。显影液和定影液的温度不应超过 18~20°C。显影的时间是 3~4 分钟(当延长显影时间时本底颗粒的量大大增加),定影时间应该长于显影时间 1.5~2 倍。定影以后样品用流动自来水冲洗 10~15 分钟。

第 VI 阶段。已洗去硫代硫酸钠的样品,可以马上用任一组织学染料染色。当用苏木精染色时应该避免染色过度,因为在暗蓝底色上银颗粒常常看不大清楚。被染色的样品通过浓度递增的酒精,石炭酸-二甲苯,二甲苯漂洗后(2~3 份)封存在树胶中。应该有足够长的时间把样品浸在绝对酒精(15~20 分钟)和二甲苯(30~40 分钟)中,以保证乳胶明胶的脱水。

至此放射自显影的制作已告完成,可以在显微镜下对它进行研究。

我们所叙述的自显影方法,能够利用来定性记录在细胞结构内放射性同位素的存在。用这个自显影的方法可以回答下面这些问题:在标记前体注入的瞬间,在该细胞内是否有 DNA 的合成(^3H -胸腺嘧啶的掺入)或者在注射一定剂量的放线菌素 D 后, RNA 合成(^3H -尿嘧啶的掺入)的抑制发生在哪一种核结构中(是否主要发生在核仁内),和一系列其他的问题(И. Д. Беляева, и др. 1971.)。

如果必须定量分析所得的结果,那么自显影的制备要求遵守一系列其它的条件。

当比较标记前体物掺入到不同生物体细胞系统或者在离体实验时标记的前体物掺入到不同样品的细胞中去的强度时,在这种情况下所应用的前体必须具有同样的比放射性强度,注射同样的剂量,注射放射性同位素后组织块和细胞悬浮液的涂片的固定也

经过同样的时间。所有标本应该用同一种乳胶覆盖，在同样条件下曝光和显影。当比较 ^3H 标记前体物掺入强度时，切片和覆盖切片的乳胶不一定要一样厚。计算出标本中细胞的一定部位（核或者细胞质）的单位面积上银粒的数目。

当定量分析 ^{14}C 或者 ^{35}S 标记前体物的掺入时，被比较的结构切片和覆盖切片的乳胶都必需一样厚。

在这种情况下要计算出在细胞上乳胶厚度上的径迹的数目。

为了进一步广泛的了解放射自显影的方法和它的应用，可参看下面的参考资料和文献（Н. Д. Грачева и др., 1960; А. А. Заварзин, 1965; О. И. Елифанова, В. В. Терских, 1969）。

大鼠肝脏组蛋白的分级分离

Н. В. Смирнова

细胞核的碱性蛋白质——组蛋白，在目前引起了很大的注意，这是由于它具有重要的生物学作用，特别是因为它参加到基因活性的调节。因此必须制订一些更完善的方法，即利用这方法能够把组蛋白的总的组分分离成各个单独的组分。下面叙述其中的一个方法。Johns 所建议的小牛胸腺组蛋白分级分离的方法是这个方法的基础，这个方法与现在称为 Johns II 的方法一样著名（Johns, 1964）。

方法的原理

这个方法不必预先提取总的组蛋白而得到比较大量的 4 类组蛋白：组蛋白 F_1 ，赖氨酸含量十分丰富，组蛋白 F_{2b} ，赖氨酸含量中等，组蛋白 F_3 ，精氨酸含量丰富，这几类组蛋白都是单一的蛋白质（De Lange, Smith, 1971）组蛋白组分 F_{2a} ，是二种蛋白质的混合

物。可将组分 F_{2a} 分为含精氨酸丰富的组蛋白 F_{2a1} 和含赖氨酸丰富的组蛋白 F_{2a2} 两个亚类(Phillips, Johns, 1965)。

组蛋白分级分离的方法是基于用酒精和不同体积的丙酮选择性地沉淀组蛋白的各个组分。

试 剂

含有 0.25 M 蔗糖, 0.025 M KCl, 0.01 M $MgCl_2$ 的 0.05 M Tris-HCl 缓冲液(pH7.55)(缩写为 TSS 缓冲液), 用于悬浮分离出来的核。

含有 0.14 M NaCl 的 0.05 M 醋酸钠缓冲液——用作抽提球蛋白用。

80% 乙醇(用 0.25 M HCl 配成)(把绝对酒精和 1.25 M HCl 溶液混合, 其体积比是 4:1)——用来选择性的抽提组蛋白 $F_3 + F_{2a}$ 。

绝对乙醇——用来透析。

0.25 M HCl 溶液——用来抽提组蛋白 $F_1 + F_{2b}$ 。

丙酮(保证试剂或者分析纯试剂)——用来沉淀组蛋白 F_1 , F_{2a} 和 F_{2b} 。

分级分离的步骤

由于小牛胸腺含有大量核, 所以建议用它来分离各种组蛋白。当用大鼠肝脏进行分离时, 我们认为最好是事先从细胞匀浆中分离出核, 然后从纯化的核中抽提组蛋白的各个组分。对于核的分离可用 Chauveau 和其同事所采用的改良法 (Chauveau et al., 1956), 此法已由 E. M. Кедрова 和 Л. В. Орлова (1968) 加以叙述。

从 10 克肝脏中分离核, 在显微镜下检查它的纯度, 将它悬浮

在 5 毫升 TSS 缓冲液中(pH7.55), 为了抽提出球蛋白, 此悬浮液与 15 毫升含有 0.14M NaCl 的醋酸钠缓冲液(pH5.1)在冷库内进行匀浆 2 分钟。匀浆液在 4°C 6000g 离心 30 分钟。这一步骤重复进行二次, 但是匀浆时间改为 30 秒钟, 匀浆液离心改为 15 分钟。上清液是含有球蛋白的组分, 弃去, 而沉淀中含有全部组蛋白组分, 悬浮在 12 毫升 80% 乙醇-0.25M HCl 中。悬浮液在 4°C 振荡 18 小时。抽提结束后悬浮液冷冻离心 6000~8000g 20 分钟。生成的沉淀再用同样的方式进行 2 次抽提, 但是所用的抽提液量比原来少(6 毫升), 时间是每次 3 小时。合并 3 次抽提后所得的离心液, 它们含有组蛋白 F_3 和 F_{2a} 。

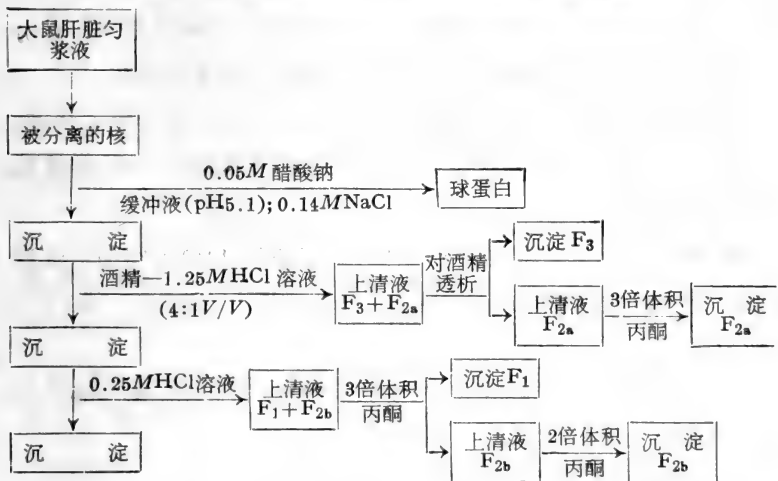
为了进一步把这些蛋白质彼此分开, 经预先过滤后的离心液在 4°C 对 500 毫升乙醇进行透析 22 小时, 在这段时间内二次更换乙醇。在透析时析出白色絮状物, 这是含精氨酸较多的组蛋白 F_3 。为了收集在透析时所生成的这个组分, 把此悬浮物在 12000g 离心 20 分钟。组蛋白 F_3 在沉淀中, 沉淀用少量酒精洗涤一次, 用丙酮洗涤二次后真空干燥。从 10 克湿重的肝脏中能够得到 5~6 毫克这种蛋白质。占所得组蛋白总量 (24~25 毫克) 的 20~23%。除去精氨酸含量丰富的组蛋白后, 剩下的上清液中含有组蛋白组分 F_{2a} , 把此组分 F_{2a} 溶于酒精中。为了使此组分沉淀, 在迅速搅拌下向上清液添加 3 倍体积丙酮后在 12000g 离心 30 分钟 (最好塞紧离心管以防丙酮蒸发)。沉淀用丙酮洗涤二次后真空干燥。组分 F_{2a} 的产量是 8.5~8.7 毫克, 占从 10 克肝脏所提取到的组蛋白总量的 35%。

用 80% 酒精-0.25M HCl 抽提组分 F_3 和 F_{2a} 后, 所留下的沉淀物中含有二种组蛋白: F_{2b} 和 F_1 。将这个沉淀用 15 毫升 0.25M HCl 溶液在冷库内振荡抽提 4 小时; 离心后所得沉淀再次用 5 毫升同样的溶液抽提 1 小时。将离心后所得的上清液合并, 过滤

和在室温下放置 15 分钟,然后在快速搅拌的情况下向它添加 3 倍体积的丙酮,在带盖的离心管中 9000~10000g 离心 30 分钟,所生成的沉淀用丙酮洗涤 3 次,真空干燥。这个沉淀中含有赖氨酸含量极高的组蛋白 F_1 。它的产量是 4.3~4.5 毫克,占所得组蛋白总量的 16~18%。

沉淀掉赖氨酸含量丰富的组蛋白后,所剩下的上清液中含有组蛋白 F_{2b} ,它的赖氨酸含量是中等的。在剧烈搅拌下通过添加 2 倍体积的丙酮和在带盖的离心管中 12000g 离心 30 分钟。沉淀用丙酮洗涤二次,真空干燥。组蛋白 F_{2b} 的产量是 6 毫克。占组蛋白总量的 24%。

下面是大鼠肝脏组蛋白分级分离的图解(图解Ⅷ)。



胶原蛋白和其他蛋白质生物合成的无细胞微粒体系统

A. E. Берман

为了研究蛋白质合成过程中翻译作用的机理及影响这个过程

的不同因素, 蛋白质生物合成的无细胞体系得到广泛的应用。下面所叙述的是由鸡胚所得无细胞微粒体系统内胶原蛋白和其他蛋白质合成的研究方法, 这个方法也能利用来研究其他动物组织蛋白质的生物合成。此法是过去所叙述过的一些方法的改良法 (Hoagland et al., 1958; Sauer, Burrow, 1972)。

试剂和溶液

所应用的试剂是光谱纯或者保证试剂 (其他规格的试剂需预先重结晶)。无标记和带标记的氨基酸用 L-型, 如是消旋的氨基酸, 那么氨基酸溶液的浓度应增加 1 倍。标记氨基酸的制品所应具有的比较放射性强度: 对于 ^{14}C -氨基酸来说不应低于 100 居里/克分子, 而对于 ^3H -氨基酸来说不应低于 1000~10000 居里/克分子。用于配制闪烁液的试剂应是光谱纯或者“闪烁纯”的。

所有溶液都用重蒸馏水配制并保存在 $2\sim 4^\circ\text{C}$ 或者冰冻状态。

1M Tris-HCl 溶液 (pH7.6)。2.5M KCl 溶液; 0.5M 醋酸盐或者 MgCl_2 溶液。

19 种无标记氨基酸溶液 (每种氨基酸浓度 $1 \times 10^{-6}\text{M}$), 溶液中不含有与标记氨基相同的氨基酸; 分装成 1~2 毫升在 -20°C 可保存一年。

10mM ATP 二钠盐溶液, 用 1M KOH 溶液中和, 在 -20°C 可保存 2 星期。

2mM GTP 溶液在 -20°C 可保存 2 星期。

0.1M 磷酸肌醇溶液在 -20°C 可保存 2 星期。

磷酸肌醇激酶 (4 毫克/毫升)。在实验当天制备。

1M 2-巯基乙醇。

标记氨基酸溶液 (200 微居里/毫升), 在无菌条件下在 -20°C 保存。

1M 醋酸溶液。

含有 0.1% 与标记氨基酸相同的无标记氨基酸的 5% 三氯醋酸(TCA)溶液。

含有 2M NaCl 的 8M 尿素溶液。

按 Lowry 方法测定蛋白质的溶液。

闪烁液: 15 克 2,5-二苯 噻 唑 (PPO) 和 50 毫克 1,4-(5-苯基)-噻唑-苯(POPOP)溶于 1 升甲苯中。

除了上述溶液外, 在开始实验前 1~2 天制备下面缓冲液。

缓冲液 A——0.25M 蔗糖, 0.1M KCl, 5mM 镁盐(氯化镁或者醋酸镁), 0.025M Tris-HCl(pH7.6)。

缓冲液 B——0.1M KCl, 5mM 镁盐, 0.025M Tris-HCl (pH 7.6)。

微粒体和翻译因子总制剂的提取

所有制备工作除了特殊规定之外, 都在 2~4°C 冷冻离心机中进行。

20~30 克鸡胚组织, 每份 5~7 克在 2.5 倍体积(克/毫升)缓冲液 A 中用具有聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器进行匀浆, 匀浆器电动机的转速是 1500 转/分。匀浆液通过二层纱布过滤, 滤液在 12000g 离心 15 分钟, 此时核和线粒体被沉淀。吸出 3/4 的上清液在 105000g 离心 1 小时。沉淀(S105-沉淀)含有微粒体。上清液(S105-上清液)吸出用来制备翻译因子。把它溶解在 3 倍体积的冷的重蒸馏水中, 在剧烈的搅拌下逐滴添加 1M 醋酸溶液, 调节到 pH5.1~5.2。析出的沉淀(pH 5-组分)含有蛋白质翻译因子, tRNA, 氨基酰-tRNA-合成酶, 在 12000g 离心 15 分钟收集后, 溶于 4~5 毫升缓冲液 B 中。逐滴的添加 1M KOH 溶液, 调节到 pH7.6。溶液在 12000g 离心 5 分钟使其澄清, 吸出上清液。吸

取此液 0.1 毫升用来测定蛋白质, 剩下的上清液在 -20°C 可保存一星期。

S105-沉淀用缓冲液 B 稍微漂洗一下, 用匀浆器把它悬浮在 4~5 毫升缓冲液 B 中。从悬浮液中吸出 0.1 毫升用来测定蛋白质, 其余的悬浮液在 -20°C 可保存 2~3 天。

蛋白质合成的无细胞系统

无细胞系统按反应的最后体积计算, 每 1 毫升中含有以下成分:

- | | |
|--------------------|------------------|
| 1. 微粒体(S105-沉淀) | 1~2 毫克(按蛋白质计算) |
| 2. pH5-组分 | 2~4 毫克(按蛋白质计算) |
| 3. Tris-HCl(pH7.6) | 25 微克分子 |
| 4. KCl | 100 微克分子 |
| 5. 镁盐(醋酸盐或者氯化物) | 5 微克分子 |
| 6. 19 种无标记的氨基酸 | 0.05 微克分子(每种氨基酸) |
| 7. ATP | 1 微克分子 |
| 8. GTP | 0.2 微克分子 |
| 9. 磷酸肌酸 | 10 微克分子 |
| 10. 磷酸肌酸激酶 | 0.4 毫克 |
| 11. 2-巯基乙醇 | 6 微克分子 |
| 12. 标记氨基酸 | 0.5 微居里 |

根据实验的目的, 试样的体积可以变化在 50~100 微升到 5~10 毫升之间。下面是一个组成无细胞系统的实例(按 10 个样品计算, 每一样品最后体积是 1 毫升)(见表 30)。

按表 30 制备组分的混合物(在冰浴中进行), 加水使混合液的体积到 7 毫升。

所添加的 Tris-缓冲液, KCl 溶液和镁盐的量可按这样的方式计算, 即在混合物中的缓冲液以及一价和二价阳离子的浓度相

当于 pH5-组分和微粒体溶液中这些离子的浓度。

表 30 蛋白质生物合成无细胞体系组分的混合物的制备

组 分	原液的浓度(M)	添加到混合液中去 的量(毫升)
Tris-HCl(pH7.6)	1.0	0.35
KCl	2.5	0.28
镁盐(醋酸盐或者氯化物)	0.5	0.07
19种无标记氨基酸	1×10^{-6} (每种氨基酸)	0.5
ATP	1×10^{-2}	1.0
GTP	2×10^{-3}	1.0
磷酸肌酸	0.1	1.0
磷酸肌酸激酶	4毫克/毫升	1.0
2-巯基乙醇	1.0	0.06
标记氨基酸	200微居里/毫升	0.03

在 10 支试管中每支各加入 0.7 毫升含有各种组分的混合物和 0.2 毫升 pH 5-组分溶液。向每支试管中加入 0.1 毫升微粒体悬浮液。组织的重量和匀浆的缓冲液(缓冲液 A)，以及 pH 5-组分溶液和微粒体悬浮液的最终体积都按上面所述的比例，每个样品含有 1~2 毫克微粒体(按蛋白质计算)和 2~4 毫克 pH 5-组分(按蛋白质计算)。仔细的搅匀后，8 个样品在 37°C 恒温水浴中保温 40 分钟，2 个样品(作为放射性吸附对照)在冰浴中放置 40 分钟。保温后样品在冰浴中冷却。

为了测定对照和实验样品中放射性掺入到蛋白质中去的情况，各吸取 0.1 毫升，分别加入含有 0.1% 与标记氨基酸相同的无标记氨基酸的 5% TCA 溶液 2 毫升。离心，沉淀用上述的 TCA 溶液洗涤和在 90°C 水浴中加热 20 分钟，此时发生了氨基酰-tRNA 的水解。悬浮液冷却后，通过孔径为 0.7~1.5 毫微米微孔滤膜过滤

(Rufs, Aufs, 捷克)。用 10 毫升 5% TCA 溶液和 5 毫升酒精洗涤滤膜几次, 干燥。然后将滤膜放到闪烁计数器的小瓶中, 小瓶中装有 10 毫升闪烁液, 测量放射性。如果掺入到蛋白质(不溶于热的 TCA 中)中去的放射性的量比被吸附的放射性高 2~3 个数量级, 可以认为这系统是有效的。

除了在无细胞系统中按放射性掺入蛋白质的强度来判断蛋白质合成的效率之外, 常常有必要分析被合成的放射性蛋白质。为了进行这种分析, 必须将被合成的蛋白质从系统中提取出来, 并和无放射性的蛋白质分开。为了这个目的, 保温后, 用浓的尿素溶液来处理这个系统(A. E. Берман и др., 1972)。

为了测定放射性, 向取出样品后所剩下的系统中添加 3 倍体积的含有 2M NaCl 的 8M 尿素溶液。混合物在冰箱中放置 2~3 天, 所凝集的物质在 105000g 离心 1 小时使其沉淀, 并弃去。上清液在水浴中 90°C 加热 20 分钟, 然后把它冷却, 对流动的自来水透析过夜, 再对蒸馏水透析 4 小时。透析液经 105000g 离心 1 小时, 收集透明的上清液, 此上清液中含有被抽提的放射性蛋白质。上述处理可以从蛋白质合成系统中分离出可被 TCA 沉淀的所合成的多肽的 40%。

在鸡胚无细胞系统中研究胶原生物合成时, 我们已指出, 经过此处理从系统中所提取的放射性物质可被高纯度的胶原酶分解, 所以能作为胶原的脯氨酸-羟化酶的底物。由此证明了上面所采用的处理能够从系统中分离出所合成的单个蛋白质。

Krebs-2腹水癌细胞无细胞蛋白质合成系统

Т. Ю. Угарова

对于外源 mRNA 的翻译作用(也就是用外加的 mRNA 合

成蛋白质) 广泛的应用 Krebs-2 腹水癌细胞抽提液。这个系统具有很多优点:

1. 从 Krebs-2 细胞所得的抽提液预保温后内源性掺入低, 便于分析合成的产物;

2. 这个系统可用于翻译几乎所有的真核生物及动物病毒的 mRNA。目前已证明, 这个系统能有效的翻译脑炎心肌炎病毒的 RNA, 不同来源的珠蛋白的 mRNA, 眼球水晶体蛋白质的 mRNA, 免疫球蛋白轻链的 mRNA, 同源细胞细胞质的 mRNA 混合物, 组蛋白的 mRNA。

系统的一般特性

将 Krebs-2 细胞的匀浆液经 30000g 离心后所得的组分 (组分 S_{30}) 用作蛋白质合成系统的成分 (核糖体, 翻译的蛋白质因子, tRNA 和氨基酸-RNA-合成酶)。在这个系统内组分 S_{30} 的浓度为每毫升 10~20 个 A_{260} 单位 (A_{260} /毫升)。

反应的混合物同样含有 30mM Tris-HCl (pH7.6), 3.5mM $MgCl_2$, 85mM KCl, 7mM 2-巯基乙醇, 1.5M ATP, 0.1mM GTP, 0.6M CTP, 10mM 磷酸肌酸, 0.02 毫克/毫升肌酸激酶, 每种无标记氨基酸 (包括谷酰胺和天冬酰胺) 各 40 μ M 和高比强的标记氨基酸 3 μ M。2-巯基乙醇和 CTP 的不是一定要的。根据我们的材料, 在无细胞体系提取和作用时 2-巯基乙醇的存在不影响合成的水平。而 CTP 明显地掺入到无细胞蛋白质合成系统的成分中去, 但是它的存在对长期作用的系统来说保证 tRNA 的 CCA 末端的再生过程是很重要的 (Aviv et al., 1971)。

放射性标记物掺入的刺激作用与所添加的 mRNA 的量有关。对于已完全除去核糖体 RNA 的 mRNA 制剂来说, 在浓度为 5~10 微克/毫升范围内观察到有显著的刺激作用, 而最适浓度的范

围(20~40 微克/毫升)因 mRNA 的分子量不同而有某些变化。

在添加腹水癌 tRNA 和网织红血球核糖体的洗涤物的蛋白质因子时能提高外源的 mRNA 翻译效率。按 Ehrenstein 的方法提取 tRNA(Ehrenstein, 1968), 加入到这个系统中去的 tRNA 量是 100~200 微克/毫升。按不同作者所引的方法(Shafritz, Anderson, 1970; Metafora et al., 1972)网织红血球核糖体的洗涤物的蛋白质因子, 添加到这个系统中去的量是 3~5A₂₈₀ 单位/毫升。

标记氨基酸的选择是以被合成的蛋白质中氨基酸的成分作为依据的。

对试剂的要求

试剂不应含有重金属盐的杂质。NaCl, KCl 和 HCl 最好用光谱纯的。Tris(三羟基氨基甲烷)可以用重结晶的商品(例如, 三次重结晶的 Tris, 英国《NBC》)或者从蒸馏过的乙醇中重结晶。把 200克 Tris 在水浴中加热的情况下溶于 2 升乙醇中, 通过漏斗热过滤。溶液在冰中冷却, 在布氏漏斗上收集结晶, 在真空干燥器中干燥。

困难的是镁盐的制剂, 因为在苏联没有市售的高纯度的制剂。镁盐必须重结晶。不重结晶时也一定要检查一下所用的试剂。2-巯基乙醇应真空蒸馏并保存在充有氮气的安瓶中。

ATP, GTP 和 CTP 制剂可用《Reanal》(匈牙利)出品的, 或者应用《Calbiochem》(英国)的, 也可用《Serva》(西德)的。在无细胞蛋白质合成系统内, 标记掺入的水平在很大程度上依赖于 ATP 的量。应当注意把三磷酸化合物在 0°C 以下保存和防止受潮。最好是把这些制剂放置在紧闭的小瓶中, 并把它放到有硅胶的聚乙烯袋中, 在 -20°C 保存。

磷酸肌酸和肌酸激酶的市售制剂(Reanal)是不大可靠的。我们发现在许多磷酸肌酸制剂中含有大量的肌酸和肌酸酐的混合物(这制剂溶解时呈乳白色),很多肌酸激酶则完全没有活性。每一种新的制剂在应用时应该先在蛋白质系统中进行检查。磷酸肌酸应保存在 4°C ,而肌酸激酶应在 -20°C 保存,并防止受潮。

最好应用 L-型和高纯度的无标记的氨基酸(一级试剂)。重要的是防止氨基酸的彼此交叉污染,因为这必然会导致标记物的稀释。为了洗涤样品,应该采用蛋白质的水解物或者与标记氨基酸相同的比较便宜的氨基酸。

标记氨基酸应该附合以下要求:

1. 有高的比放射性强度,对于 ^{14}C -氨基酸应该具有 $200\sim 400$ 居里/ M ,而对于 ^3H -氨基酸还应高 $1\sim 2$ 数量级;
2. 是无菌的;
3. 不含有酸溶性的标记物。

英国(Amersham)出售的氨基酸附合这些要求。也可应用捷克斯洛伐克出品的比放射性强度较低的制剂,但是在这种情况下最好是用几种($2\sim 4$)氨基酸的混合物。

缓冲溶液

所有溶液都应用无离子水或者三次蒸馏的重蒸馏水配制,并通过玻璃滤器过滤。器皿和过滤器在使用前应该消毒。

用三种原液配制缓冲液。

$1M$ Tris-HCl 溶液, $\text{pH}7.6$ (121.1 克 Tris 溶于 1 升水中),溶液的 pH 可用 $1M$ HCl 来调节。在配制后的第二天将缓冲液调到所需的 pH 值。

$2M$ KCl 溶液(149 克溶于 1 升水中)。

$1M$ MgCl_2 溶液。氯化镁的含水量是不恒定的,因此应根据密

度配制溶液。 $1M$ 的溶液在 $20^{\circ}C$ 时密度是 1.0717 。

也可以利用 $1M$ 醋酸镁溶液(214 克 $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ 在 1 升中)。

缓冲液 A—— $35 mM$ Tris-HCl($pH7.6$)和 $140 mM$ NaCl 用来洗涤细胞。先配制 10 倍浓度的溶液,而在使用时用冷水稀释 10 倍。为了配制 10 倍浓度的溶液可称取 81.9 克 NaCl 和 350 毫升 $1M$ Tris-HCl 溶液($pH7.6$)。

缓冲液 B—— $10 mM$ Tris-HCl($pH7.6$), $10 mM$ KCl, $1.5 mM$ $MgCl_2$ 。用来使细胞渗透休克。为了配制 100 毫升 10 倍浓度的缓冲液,可取 10 毫升 $1M$ Tris-HCl ($pH7.6$), 5 毫升 $2M$ KCl 和 1.5 毫升 $1M$ $MgCl_2$ 。使用前用冷水稀释 10 倍。

缓冲液 C——把它添加到细胞匀浆中,其量为匀浆体积的 $1/9$,其目的是调节匀浆液中各物质的最终浓度: $30 mM$ Tris-HCl ($pH7.6$), $125 mM$ KCl, $5 mM$ $MgCl_2$ 和 $7 mM$ 2-巯基乙醇。制备缓冲液时要计算盐的浓度使它能使细胞渗透休克。为了配制 100 毫升缓冲液,取 21 毫升 $1M$ Tris-HCl($pH7.6$), 58 毫升 $2M$ KCl 和 3.75 毫升 $1M$ $MgCl_2$ 。使用前每 10 毫升缓冲液中添加 50 微升 $15M$ 2-巯基乙醇。

缓冲液 D—— $30 mM$ Tris-HCl ($pH7.6$), $85 mM$ KCl, $3.5 mM$ $MgCl_2$ 和 $7 mM$ 2-巯基乙醇。抽提物通过 Sephadex 柱时应用此缓冲液。为了配制 100 毫升 10 倍浓度的溶液,取 30 毫升 $1M$ Tris-HCl($pH7.6$), 42.5 毫升 $2M$ KCl 和 3.5 毫升 $1M$ $MgCl_2$ 。使用前用冷水稀释 10 倍,每升工作液中添加 0.5 毫升 $15M$ 2-巯基乙醇。 10 倍浓度的缓冲液用作无细胞系统的盐的混合液。

用于无细胞系统的试剂的制备

将三磷酸化合物, ATP-再生系统成分, 无标记氨基酸和盐以

混合物形式加入到 15 毫升样品中。下表所示是各个原液的配制和由这些溶液组成混合液的方法(表 31)。如果所利用的试剂不同于表中所示的分子量,那么要把其折算一下。根据在水内的溶解度和稳定性来分类配制成几类氨基酸原液。

由原液配制无细胞系统的反应混合物。

混合物 I ——为了使样品与标记的氨基酸一起保温——不应含有与标记氨基酸(赖氨酸)相同的氨基酸,表 32 是用于 100 个样品(每个样品的体积为 0.1 毫升)所制备的混合物。

混合物 II ——用于组分 S_{30} 的预先保温——含有一整套无标记的氨基酸,在混合物 II 中没有盐。表 32 是用于 10 毫升组分 S_{30} 预先保温的混合液配制的方法。

混合物成分当中稳定性最低的是肌酸激酶。其次是 2-巯基乙醇,最好在实验当天添加。其余试剂混合物能在 -20°C 保存几星期。

腹水细胞的制备

Krebs-2 腹水癌细胞用转接法保存在非品种的雌性小白鼠中,鼠的体重是 20 克。给动物腹腔注射 0.2~0.25 毫升新鲜收集的腹水。注射以后收集 6~7 天的细胞。可用颈椎骨移位的方法杀死老鼠,用 70% 乙醇把鼠腹部上的毛擦洗干净,在腹部上划一刀,拉开皮肤,腹膜穿刺,尽可能不损伤血管,把腹水倒入几个离心杯中,杯中装有半杯冷缓冲液 A,冲满。当肿瘤正常生长的情况下每只小鼠能得到 5~10 毫升腹水,含有将近 1×10^8 细胞/毫升。由 3~4 只小鼠中所得的细胞足够用来进行实验。

如果腹水中含有血污或者死细胞的凝块,那么就不能应用。

表 31 试剂的配制和保存

溶液号	成 分	分子量	称量 (毫克)	溶剂体积	备 注
1	ATP, 二钠盐	623	93.4	0.5毫升水	溶液以石蕊试纸作指示剂, 用 KOH 中和在 -20°C 保存
2	GTP, 三锂盐 $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	631	6.3	0.5毫升水	保存在 -20°C
3	CTP, 钠盐 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	563	34.0	0.5毫升水	同上
4	磷酸肌酸 $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	363	181.2	1.0毫升水	同上
5	肌酸激酶	—	2.0	0.5毫升水	溶液不应保存, 现配现用
6	L-谷氨酰胺	162	3.2	2.0毫升水	以少量分装, 保存在 -20°C , 不重复冷冻
7	L-酪氨酸	181	3.6	4.0毫升0.1 M HCl 溶液	当加热时溶解, 在 4°C 保存, 在加入前混合, 用 KOH 中和混合物
8	17种氨基酸混合物:			20毫升 H_2O	混合物不含有赖氨酸(用标记赖氨酸工作时)。如利用其他标记氨基酸时, 赖氨酸可加入到混合物中去(称取 7.3毫克), 而应该从溶液成份中排除与标记氨基酸相同的氨基酸, 分装成每份 1~2毫升, 在 -20°C 可保存一年
	甘氨酸	75	3.0		
	L-丙氨酸	89	3.6		
	L-丝氨酸	105	4.2		
	L-缬氨酸	117	4.7		
	L-亮氨酸	131	5.2		
	L-异亮氨酸	131	5.2		
	L-甲硫氨酸	149	5.9		
	L-脯氨酸	115	4.6		
	L-苏氨酸	119	4.8		
	L-苯丙氨酸	165	6.6		
	L-色氨酸	204	8.2		
	L-精氨酸 $\cdot \text{HCl}$	211	8.4		
	L-组氨酸 $\cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	210	8.4		
	L-谷氨酸	147	5.9		
	L-天冬氨酸	133	5.3		

续上表

溶液号	成分	分子量	称量 (毫克)	溶剂体积	备注
9	L-天冬酰胺·H ₂ O	150	6.0	20毫升水	分装成每份1~2毫升在 -20℃可保存一年
	L-半胱氨酸	157	6.2		
	混合物中含有18种 氨基酸: 即在上面 溶液8中再补加L- 赖氨酸·HCl	183	7.3		

表 32 用于蛋白质生物合成的无细胞系统试剂混合物的配制

溶 液	加入溶液的体积(毫升)	
	混合物 I	混合物 II
1 (ATP)	0.05	0.05
2 (GTP)	0.05	0.05
3 (CTP)	0.05	0.05
4 (磷酸肌酸)	0.20	0.20
5 (肌酸激酶)	0.05	0.05
缓冲液 D, 10倍浓度	0.7	—
6 (谷氨酰胺)	0.04	0.04
7 (酪氨酸)	0.08	0.08
8 (17种氨基酸混合物)	0.2	—
9 (18种氨基酸混合物)	—	0.2
1.5M 2-巯基乙醇	0.04	—
水	0.04	—
混合物总的体积	1.5	0.72

组分 S₃₀ 的提取

所有的步骤除了有专门规定的外, 都在冷的情况下进行。所

收集的细胞在 2000g 离心 5 分钟使其沉淀, 二次用缓冲液 A 离心洗涤, 转速与时间同上。然后细胞悬浮在小体积(20~40 毫升) 缓冲液 A 中, 再转移到尖底的离心杯中, 在 6000g 离心 10 分钟。吸出上清液, 向致密的细胞沉淀添加 2 倍体积低渗缓冲液(缓冲液 B)。仔细地搅匀细胞, 放置 10 分钟使其膨胀。必须注意观察细胞的膨胀过程, 可应用相差显微镜进行观察。膨胀的细胞在玻璃匀浆器中用研杵上下往返 5~15 次, 机械破碎。破碎的程度同样可用显微镜检查, 细胞的破碎程度不应低于 50%。添加缓冲液 C(相当于匀浆体积的 1/9), 将匀浆各种物质的最终浓度为: 30mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 和 7 mM 2-巯基乙醇。30000g 离心 10 分钟(High Speed 18, 转头 8×50, 16000 转/分)收集上清液(组分 S₃₀), 尽可能去掉上面脂肪层。

组分 S₃₀ 的预保温

在全套无标记氨基酸, ATP, GTP, CTP 和 ATP 再生系统的存在下进行抽提液的预保温。上述成分的最终浓度同保温混合液一样(见《系统的一般特征》一节), 向组分 S₃₀ 添加混合物 II, 每毫升抽提液添加 0.072 毫升混合液在 37°C 保温 50 分钟。一般是用 2~3 毫升抽提液作预保温。这个体积用来上 Sephadex 柱是适合的, 对于 50~70 个样品的实验是足够了。

将预先保温的组分 S₃₀ 在水浴中冷却后在 30000g 离心 10 分钟, 从沉淀中小心倾出上清液。

组分 S₃₀ 通过 Sephadex 凝胶柱

为了除去氨基酸和更换缓冲液, 必须把组分 S₃₀ 通过 Sephadex G-25 柱。把 Sephadex 凝胶装满柱, 柱子在三次重蒸的蒸馏水内保存, 上样前用缓冲液 C 平衡柱。柱内 Sephadex 凝胶的体

积应该大于上样量(抽提液)体积 7~10 倍。制剂上柱后, 以低速流出并把它收集(每分钟 6~8 滴)。通常可用流出洗脱液的混浊程度来发现所需要的组分, 但是必须知道柱的排空体积, 因为在许多情况下经过预保温后抽提液几乎是透明的, 在这种情况下, 可根据体积来收集组分。开始洗脱下来的几滴制剂由于被缓冲液极大的稀释, 可把其弃去, 而收集制剂的中等浓缩部分(1.5~2.0 毫升)。

为了估计抽提液的浓度, 向 30 微升所收集的组分添加 3 毫升水和用分光光度计在波长 260 nm 处测其光密度。抽提液的浓度通常在 30~60 A_{260} 单位/毫升范围内, 抽提液可在 -70°C 保存。如果没有 -70°C 的冰箱, 那么抽提物必须在提取出来后当天就应用。

样品的成分和保温条件

所用 0.1 毫升的样品中含有 15 微升混合物 I 和 30 微升经过预保温和再通过 Sephadex G-25 柱的组分 S_{30} 和 20 微升标记氨基酸。如果 RNA 或者其他的附加成分不加入到样品中去, 那么对 0.1 毫升的样品加入 35 微升三次重蒸馏的蒸馏水。所有加进去的附加成分不应多于 35 微升而且它们不应该含有盐。添加到样品中去的各成分的次序为: 试剂混合物, 计算好的水量, 组分 S_{30} , mRNA, 标记氨基酸。其它的补加物(tRNA 或者从网织红血球核糖体洗涤下来的因子) 应在添加 mRNA 之前加进去。对于每一个不同设计的实验都应有二个平行的样品。样品在保温前仔细搅拌, 在 37°C 保温 60 到 90 分钟。为了避免样品体积由于蒸发而变化, 因此需在密闭的恒温器内进行保温, 恒温器的内部被水蒸汽饱和。两个含有全部反应系统成分的对照用来排除, 标记物的非特异吸附。对照试验在 0°C 进行保温。

反应的停止和样品的处理

添加 0.2 毫升 0.1M KOH 溶液以停止反应, 此溶液中含有 0.1% 与标记氨基酸相同的无标记氨基酸, 样品在 37°C 保温 20 分钟为的是使氨基酰-tRNA 水解。在这个阶段样品能在冰箱中放置过夜。然后向样品添加 2 毫升冷的 10% TCA 溶液, 此 TCA 溶液中含有 0.1% 无标记的氨基酸, 样品在冷库内放置 10 分钟, 用微孔滤膜(Rufs 捷克)过滤, 滤膜预先用含有 0.1% 无标记氨基酸的 TCA 溶液湿润。试管用 5% TCA 溶液洗涤 3 次, 每次 4 毫升, 然后滤膜用 10 毫升 5% TCA 溶液洗涤, 再用 5 毫升乙醇洗涤。在滤膜上酸不溶性沉淀部分的放射性可在闪烁计数器甲苯闪烁液中进行测定。

方法的练习

在建立方法时, 第一个实验最好用没有预先保温过的组分 S_{30} 进行。高水平的内源性掺入将证明抽提物的制备是正确的和试剂质量是好的。如果在实验样品中掺入到蛋白质中的放射性高于对照样品(非专一吸附)的放射性 1~2 数量级, 可认为此系统是有活性的。

保温前组分的活性, 也就是它翻译外源性模板的能力, 可用添加多聚(U)后, 带标记的多聚苯丙氨酸的合成来检验。进行多聚(U)翻译时在系统中盐的最终浓度应提高到 125 mM KCl 和 7.5 mM $MgCl_2$ 。

如果在二个对照实验中都得到正的结果, 但是在添加 mRNA 时没有促进其掺入, 那么就应该注意到 mRNA 的量是否足够。为了制备彻底除去蛋白质的很好纯化的制剂和避免 RNA 被核糖核酸酶降解, 因此用 mRNA 进行研究时应该遵守 Бедткер 所述的

定则(X. Бедткер, 1970)。即必须肯定加入到无细胞系统中去的 RNA 制剂是已除去了酒精、去污剂、EDTA 和其他杂质(这些物质的添加是为了抑制核糖核酸酶的)。

附 录

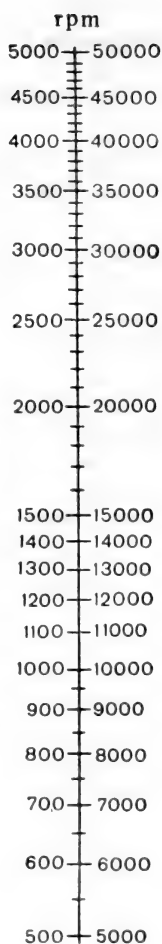
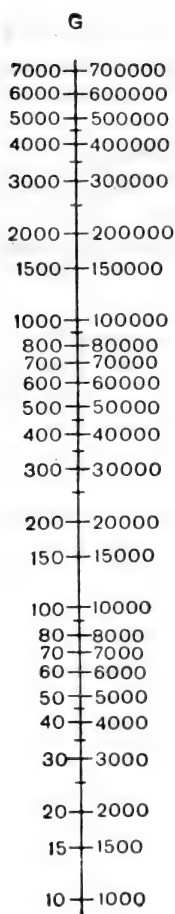
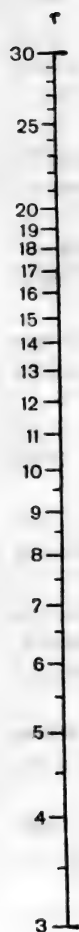
计算G值的列线计算图。G值是在离心机中离心力($\omega^2 r$)的加速度对地心引力($g=980$ 厘米/秒²)的加速度之比值。

$$G = 1.11 \times 10^{-5} \times r \times V^2$$

式中 r = 转轴到离心管中间的距离, 以厘米来表示, V = 转头的转速(转数/分)。

为了根据列线计算图计算G值, 必须把半径长度(r)和转头的转速(转数/分)两者用直线连接起来。从两线的交叉点来确定G值。应该注意标尺G左面的数值相应于《转数/分》标尺左面的数值。而G标尺右面的数值相应于《转数/分》标尺右面的数值。

用列线计算图也能反过来从要求得到的G值算出一定半径的转头所能给出的每分钟转数。



参 考 文 献

- Алексеев Л. П., Орехович В. Н. Новый микрометод определения монозамещенных гуанидинов на основе модифицированной реакции Сакагучи. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, с. 203—206.
- Беленький Д. М., Розенфельд Е. Л. Использование α -метилглюкозида для очистки γ -амилазы и некоторые свойства очищенного фермента. — «Докл. АН СССР», 1971, т. 199, № 3, с. 708—711.
- Беленький Д. М., Цукерман Д. Б., Розенфельд Е. Л. Очистка и свойства кислой α -глюкозидазы (γ -амилазы) из печени человека. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 927—933.
- Беляева И. Д. Редупликация ДНК в двуядерных клетках регенерирующей печени. — «Бюлл. экспер. биол.», 1971, № 5, с. 99—102.
- Берман А. Е., Замараева Т. В., Мазуров В. И. О биосинтезе коллагена в бесклеточной микросомной системе из куриных эмбрионов. — «Молекулярная биол.», 1972, № 5, с. 783—790.
- Бурсова Л. В., Вьюгова Л. А., Горкин В. З. Метод определения активности моноаминоксидазы мозга. — «Укр. біохім. ж.», 1965, № 3, с. 463—471.
- Букин Ю. В. Микрометод определения пиридоксалькиназы и некоторые области его применения. — «Прикладная биохимия и микробиология», 1973, т. 9, № 2, с. 286—302.
- Букин Ю. В., Сергеев А. В. Получение препарата апофермента триптофаназы *Escherichia coli*, освобожденного от примеси холофермента. — «Прикладная биохимия и микробиология», 1970, т. 6, № 4, с. 456—461.
- Видершайн Г. Я. 6-Дезоксисахара, их свойства, распространение и ферментативные превращения в организме человека и животных. — «Вопр. мед. химии», 1968, т. 14, с. 115—130.
- Видершайн Г. Я., Колибаба Л. Г. Методы определения свободных и связанных 6-дезоксигексоз. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, с. 428—439.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., «Наука», 1972, 252 с.
- Георгиев Г. П., Мантыева В. Л. Информационная и рибосо-

мальная рибонуклеиновые кислоты хромосомно-ядрышкового аппарата, методы разделения и нуклеотидный состав. — «Биохимия», 1962, т. 27, с. 949—957.

Гинодман Л. М. Хроматография белков на ионообменниках и фракционирование смесей, содержащих белки, на колонках с сефадексом. В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1964, с. 37—73.

Горкин В. З. Трансформация ферментов. — «Вопр. мед. химии», 1972, т. 18, с. 118—136.

Горкин В. З., Кривченкова Р. С. Дезаминирование некоторых биогенных моноаминов и активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий. — «Вопр. мед. химии», 1971, т. 17, с. 65—72.

Городецкий В. К. Определение различных редуцирующих сахаров в биологических жидкостях методом хроматографии на бумаге. В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 350—364.

Городецкий В. К., Щорс Е. И. Определение кетосахаров в биологических жидкостях с помощью β -индолилуксусной кислоты. — «Вопр. мед. химии», 1969, т. 15, с. 310—314.

Горяченкова Е. В., Щербатюк Л. И., Воронина Е. А. Получение высокоочищенных препаратов диаминооксидазы из почек свиньи. — «Биохимия», 1967, т. 32, с. 398—402.

Гусев А. И. Микрометод преципитации в агаре. — В кн.: Иммунохимический анализ. М., 1968, с. 99—119.

Гурвич А. Е., Кузовлева О. Б., Туманова А. Е. Применение иммуносорбентов в виде суспензии для определения абсолютного содержания антител. — «Биохимия», 1962, т. 27, с. 246—251.

Давыдова С. Я. Выделение плазматических мембран животных клеток и некоторые их свойства. — «Биохимия», 1968, т. 33, с. 685—693.

Дервиз Г. В. Методы изучения обмена хромопротеидов. — В кн.: Биохимические методы исследования в клинике. Под ред. А. А. Покровского. 1969, М., с. 365—367.

2,4-Динитрофенил-производные пептидов-субстраты нового типа для определения активности протеолитических ферментов. Определение активности карбоксипептидаз. — «Биохимия», 1973, т. 38, с. 790—795. Авт.: Л. А. Люблинская, Т. И. Воганова, Т. С. Пасхина, В. М. Степанов.

Дризмх Г. И., Гурвич А. Е. Использование антител, присоеди-

- ненных к фиксированному на нерастворимой основе антигену, для специфического извлечения различных белков. — «Биохимия», 1964, т. 29, с. 1054—1062.
- Егорова Т. П., Пасхина Т. С.* Очистка кининогена (брадикининогена) из плазмы крови кролика и изучение его свойств. — «Биохимия», 1967, т. 32, с. 354—362.
- Елисеева Ю. Е., Орехович В. Н.* Выделение и изучение специфичности карбоксикатепсина. «Докл. АН СССР», 1963, т. 153, № 4, с. 954—956.
- Епифанова О. И., Терских В. В.* Метод радиоавтографии в изучении клеточных циклов. М., «Наука», 1969, 119 с.
- Златопольский А. Д., Трудюлюбова М. Г., Лерман М. И.* Изучение метаболизма полирибосом, связанных с эндоплазматическими мембранами. — «Биохимия», 1973, т. 38, с. 124—135.
- Ивлев В. А., Ивлева И. Н., Садков А. П.* Манометрический стеклянный сосуд для измерения низких давлений в присутствии жидкой фазы. — В кн.: Машины и приборы для испытания материалов. М., 1971, с. 200—201.
- Изучение α -1,4- и α -1,6-полиглюкозидаз животных тканей.* — «Биохимия», 1959, т. 24, с. 1047—1053. Авт.: Е. Л. Розенфельд, И. С. Лукомская, Н. К. Рудакова, А. И. Шубина.
- Казакова О. В., Орехович В. Н.* Выделение катепсинов группы D с помощью хроматографии по сродству. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 969—972.
- (Карбоксикатепсин—ключевой компонент двух физиологических систем, участвующих в регуляции кровяного давления). Carboxycathepsin—a key regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure.* — «Clin. chim. Acta», 1971, v. 31, p. 413—419. Авт.: Yu. E. Eliseeva, V. N. Orekhovich, L. V. Pavlikhina, L. P. Alexeenko.
- Карбоксикатепсин—ключевой фермент двух систем, регулирующих кровяное давление.* — «Вопр. мед. химии», 1970, т. 16, с. 646—649. Авт.: Ю. Е. Елисеева, В. Н. Орехович, Л. В. Павлихина, Л. П. Алексеев.
- Карманский И. М.* Выделение и изучение четвертичной структуры фитогемагглютинина. Дис. канд., М, 1972.
- (Количественное определение степени чистоты препаратов субклеточных структур). A quantitative estimation of degree of purity of preparations of subcellular structures.* — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 54, p. 223—233. Авт.: A. J. Archakov, L.

- Ф. Panchenko, А. В. Kapitanov, J. J. Efron, Т. А. Knyazeva, N. S. Zherbakova.
- Крайнова Б. Л., Кипоренко С. С., Чаман Е. С.,** Синтез о-гиппурил- δ -гуанидино- α -L-оксивалериановой кислоты (о-гиппурил-L-аргининовой кислоты). — «Ж. орг. химии», 1970, т. 40, с. 708—709.
- Лауфер А. Л., Гуликова О. М., Пасхина Т. С.** О двух кининогеназах в плазме крови человека. — «Биохимия», 1969, т. 34, с. 3—6.
- Лейтин В. Л., Лерман М. И.** Изучение полирибосом из клеток печени крысы. Препаративный метод получения полирибосом. — «Биохимия», 1969, т. 34, с. 839—848.
- Лейтин В. Л., Лерман М. И.** Определение времени синтеза полипептидной цепи в опытах на животных. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 513—520.
- Лейтин В. Л., Лерман М. И.** Кинетика синтеза полипептидной цепи *in vivo*: эффект ингибиторов трансляции. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 1060—1070.
- Лукомская И. С., Городецкий В. К.** Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы в крови в норме и при диабете. — «Биохимия», 1961, т. 26, с. 477—482.
- Методы** исследования активности и специфического торможения моноаминоксидаз митохондрий. В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 155—177. Авт.: В. З. Горкин, И. В. Веревкина, Л. И. Гриднева, Л. В. Жердева, Л. Б. Кляшторин, Р. С. Кривченкова, Н. В. Комиссарова, Г. А. Леонтьева, Л. А. Романова, И. С. Северина, С. М. Фейгина.
- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С.** Очистка и свойства кислото-стабильного ингибитора трипсина из сыворотки крови кролика. — «Биохимия», 1969, т. 34, с. 282—292.
- Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С.** Кинетика торможения активности термо- и кислотостабильным ингибитором из сыворотки крови кролика. — «Биохимия», 1970, т. 35, с. 187—195.
- Никольский Б. П., Шульц Т. Т., Пешехонова Н. В.** Теория стекляннного электрода. VII Влияние посторонних ионов на натриевую и калиевую функцию стеклянных электродов. — «Ж. физ. химии», 1958, т. 32, № 1, с. 19—26.
- О возможности** «трансформации» митохондриальной моноаминоксидазы в диаминоксидазоподобный фермент. — «Вопр. мед. химии»,

- 1968, т. 14, с. 538—554. Авт.: В. З. Горкин, Ж. И. Акопян, Е. Н. Гончаренко, Ю. Б. Кудряшов.
- О структуре* рибосом из печени. — «Молекулярная биол.», 1973, т. 7, № 4, с. 609—619. Авт.: Н. А. Киселев, В. Я. Стельмашук, М. И. Лерман, О. Ю. Абакумова.
- Определение* брадикинина при помощи биологических и хроматографических методов. В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 205—231. Авт.: Т. С. Пасхина, О. М. Гуликова, Т. П. Егорова, М. С. Суровикина, Р. К. Шмырева.
- Очистка* и модифицирование каталитических свойств аминоксидаз. — «Вопр. мед. химии», 1972, т. 18, с. 356—364. Авт.: Ж. И. Акопян, Р. И. Гвоздев, Г. У. Молодых, Л. Н. Стесина, Л. В. Татьяненко, Г. Н. Яковлева, В. З. Горкин.
- Пасхина Т. С.* Биохимические основы патологии сердечно-сосудистой системы (механизм образования, обмен и роль при сосудистых патологиях кининов плазмы крови). В кн.: Молекулярные основы патологии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., 1966, с. 123—172.
- Пасхина Т. С.* Энзиматический механизм образования и распада кининов. — В кн.: Современные вопросы эндокринологии. Под ред. Н. А. Юдаева, Вып. 4. Химия и биология пептидно-белковых гормонов. М., 1972, с. 108—122.
- Пасхина Т. С., Егорова Т. П.* Очистка и свойства кининогена (брадикининогена) из сыворотки крови кролика. — «Биохимия», 1966, т. 31, с. 468—476.
- Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф.* Кислотостабильный ингибитор трипсина, плазмина и калликреина из сыворотки крови кролика. — «Вопр. мед. химии», 1966, т. 12, с. 326—327.
- Пасхина Т. С., Яровая Г. А.* Калликреин сыворотки крови человека. Активность фермента и хроматографический метод определения. — «Биохимия», 1970, т. 35, с. 1055—1058.
- Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блиникова Е. И.* Калликреиноген сыворотки крови человека. Метод определения и некоторые свойства. — «Биохимия», 1973, т. 33, с. 420—423.
- Пасхина Т. С., Кринская А. В., Зыкова В. П.* Сравнительное влияние ингибиторов трипсина пептидно-белковой природы (основного панкреатического ингибитора трипсина, ингибиторов из молозива коровы и бобов сои) на калликреины из сыворотки крови человека и кролика. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 302—

Пособие по гистоавторадиографии. Л., 1960, 51 с, Авт.: Н. Д. Грачева, Г. С. Лыкова, Л. В. Фунштейн, Э. Н. Щербань.

Роль кининовой системы в патогенезе ожоговой болезни человека. — «Вопр. мед. химии», 1972, т. 18, с. 137—145. Авт.: Т. С. Пасхина, М. И. Шрайбер, Г. А. Яровая, Н. А., Морозова, В. Ф. Нартикова, С. С. Трапезникова, В. Л. Доценко, О. В. Макарова, Т. М. Маслова.

Состояние системы калликреиноген-калликреин в сыворотке крови больных с поражениями печени. — В кн.: Материалы 2-го Всесоюзн. симпозиума по медицинской энзимологии. Душанбе, 1974, с. 21—22. Авт.: Т. С. Пасхина, З. А. Бондарь, А. В. Кринская, Д. Г. Поликарпова.

Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. — «Биохимия», 1958, т. 23, с. 656—662.

Торчинский Ю. М., Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков. М., «Наука», 1971, 230 с.

Трапезникова С. С., Пасхина Т. С. Выделение, очистка и свойства карбоксипептидаз (кининаз) из сыворотки крови человека и кролика. — «Биохимия», 1968, т. 33, с. 1012—1022.

Файс Д., Шакулов Р. С., Клячко Е. В. Диссоциация монорибосом животных клеток. — «Молекулярная биол.», 1970, т. 4, № 2, с. 232—239.

Характеристика рибосомного материала клеток печени крыс, отравленных этионином. Получение и свойства активных рибосомных субъединиц из одиночных рибосом, накапливающихся при действии этионина. — «Биохимия», 1973, т. 38, с. 35—51. Авт.: О. Ю. Абакумова, Д. А. Иванов, Т. Ю. Угарова, В. Г. Шелехова, М. И. Лерман.

Химические и биологические методы определения основных компонентов кининовой системы крови (кининогена, калликреина, ингибиторов калликреина, киназаы). — В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В. Н. Ореховича, М., 1968, с. 237—241. Авт.: Т. С. Пасхина, Т. П. Егорова, В. П. Зыкова, А. Л. Лауфер, С. С. Трапезникова, Е. Е. Шимонаева.

Цветков В. С., Иммуноэлектрофорез и препаративный электрофорез в агаре. — В кн.: Иммунохимический анализ. М., 1968, с. 120—142.

Ямафудзи Кэйко, Идзумия Нобуо. Механизм активности кининоге-

- на.—«Кагаку, Chemistry» (Jap.), 1971, т. 26, с. 114—118. Реф.
 «Рефер. ж. биол. химия», 1971, 13Ф602.
- A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.* — «J. Biol. Chem.», 1958, v. 231, p. 241—257. Aut.: M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecnik.
- Adelman M. R., Blobel G., Sabatini D. D.* An improved cell fractionating procedure for the preparation of rat liver membrane bound ribosomes. — «J. Cell Biol.», 1973, v. 56, p. 191—205.
- Anderson G. W., Zimmermann G. E., Gallahan F.* The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. — «J. Am. Chem. Soc.», 1964, v. 86, p. 1839—1842.
- Astrup T.* Comparative studies of some antifibrinolytic agents and proteinase inhibitors. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1968, v. 146, p. 601—611.
- Aviv U., Boime J., Lederer P.* Protein synthesis directed by encephalomyocarditis virus RNA: properties of transfer RNA-dependent system. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1971, v. 68, p. 2303—2307.
- Barker S. B., Summerson W. H.* The colorimetric determination of lactic acid in biological material. — «J. Biol. Chem.», 1941, v. 138, p. 538—554.
- Beeley I. G., McCarins E.* Selective isolation of ovomucoid using an insolubilized trypsin derivative. — «Biochem. Biophys. Acta», 1970, v. 271, p. 204—213.
- Bergman I., Loxley A.* Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. — «Analyt. Chem.», 1963, v. 35, p. 1961—1965.
- Bhattacharyya A. K., Aminoff D.* Estimation of free methylpentoses in the presence of glycosidically bound sugar. — «Analyt. Biochem.», 1966, v. 14, p. 278—289.
- Blobel G., Potter V. R.* Ribosomes in rat liver: an estimate of the percentage of free and membrane bound ribosomes interacting with messenger RNA in vivo. — «J. Molec. Biol.», 1967, v. 28, p. 539—542.
- Blobel G., Potter V. R.* Distribution of radioactivity between the acidsoluble pool and the pools of RNA in the nuclear non-sedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid. — «Biochem. Biophys. Acta», 1968, v. 166, p. 48—57.
- Blobel G., Sabatini D.* Dissociation of mammalian polyribosomes

- into subunits by puromycin. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1971, v. 68, p. 390—394.
- (Boedtker H.) Бедткер Х. Молекулярный вес и конформация РНК. В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 251—272.
- Brawermann G., Mendecki J., Lee S. J. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. — «Biochemistry (Wash.)», 1972, v. 11, p. 637—641.
- Breakdown and reassembly of rat liver ergosomes after administration of ethionine or puromycin. — «J. Biol. Chem.», 1964, v. 239, p. 3826—3833. Aut.: S. Villa Trevino, E. Farber, T. Staehelin, F. O. Wettstein, H. Noll.
- Breuer B., Florini J. R. Amino acid incorporation into protein by cell-free systems from rat skeletal muscle. — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 1544—1549.
- Bruni C. B., Auricchio F., Covelli I. Acid- α -D-glucoside glycohydrolase from cattle liver. — «J. Biol. Chem.», 1969, v. 244, p. 4735—4748.
- Brunschede H., Bremer H. Synthesis and breakdown of proteins in *Escherichia coli* during amino acid starvation. — «J. Molec. Biol.», 1971, v. 57, p. 35—57.
- Butterworth P. H., Baum H., Porter J. W. A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups. — «Arch. Biochem.», 1967, v. 118, p. 716—723.
- Caldwell P. C. An investigation of the intracellular pH of crab muscle fibres by means of micro-glass and microtungsten electrodes. — «J. Physiol. (Lond.)», 1954, v. 126, p. 169—180.
- Carboxypeptidase in blood and other fluids. Values in human blood in normal and pathological conditions. — «Clin. Chem. Acta», 1965, v. 11, p. 39—43. Aut.: E. G. Erdös, J. W. Woher, M. I. Levine, M. P. Westerman.
- Carboxypeptidase in blood and other fluids. III. The esterase activity of the enzyme. — «Biochem. Pharmacol.», 1967, v. 16, p. 1287—1297. Aut.: E. G. Erdös, H. Y. Yang, L. L. Tague, N. Manning.
- Charles F. H., John A. J. Rat liver membrane preparations. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 49, p. 290—293.
- Chauveau J., Moule J., Rouiller C. Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition. — «Exp. Cell Res.», 1956, v. 11, p. 317—321.

- Chauvet I., Acher R.* Isolation of a trypsin inhibitor from bovine ovary by affinity chromatography through trypsinsepharose. — «FEBS Letters», 1972, v. 23, p. 317—320.
- Chemistry of renin substrate.* — «Canad. Med. Ass. J.», 1964, v. 90, p. 185—200. Aut.: L. T. Skeggs, K. E. Leutz, H. Hochstrasser, J. R. Kohn.
- Chromosome constitution of a human phenotypic intersex.* — «Am. J. Hum. Genet.», 1959, v. 11, p. 215—236. Aut.: D. A. Hungerford, A. J. Donnelly, P. C. Nowell, S. Beck.
- Cirrhosis associated with alfa-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorders.* — «J. Lab. Clin. Med.», 1969, v. 73, p. 934—939. Aut.: H. L. Sharp, R. A. Bridges, W. Krivit, E. F. Freier.
- Claude A.* Studies on cells: morphology, chemical constitution and distribution of biochemical functions. — «Harvey Lect.», 1948, v. 43, p. 121—164.
- Cohen S.* Purification of a nerve growth-promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1960, v. 46, p. 302—311.
- Colman R. W., Mattler L., Sherry S.* Studies on the prekallikrein (kallikreinogen)-kallikrein in enzyme system of human plasma. 1. Isolation and purification of plasma kallikreins. — «J. Clin. Invest.», 1969, v. 48, p. 11—22.
- Cooper R.* The colorimetric measurement of succinate dehydrogenase activity in subcellular fractions. — «J. Biol. Educ.», 1967, v. 1, p. 57—63.
- Corvol P., Devaux C., Menard J.* Pepstatin, an inhibitor for renin purification by affinity chromatography. — «Febs Letters», 1973, v. 34, p. 189—193.
- Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.* Affinity chromatography. — In: Methods in Enzymology. v. 22. New York, 1971, v. 345—379.
- Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.* Selective enzyme purification by affinity chromatography. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1968, v. 61, p. 636—643.
- Dahlqvist A.* Assay of intestinal disaccharidases. — «Enzymol. Biol. Clin.», 1970, v. 11, p. 52—66.
- Dahlqvist A., Brun A.* A method for the histochemical demonstration of disaccharidase activities application to invertase and trehalase in some animal tissues. — «J. Histochem. Cytochem.», 1962, v. 10, p. 294—302.

- Dallner G.* Studies on the structural and enzymic organisation of the membraneous elements of liver microsomes. — «Acta Pathol. Microbiol. Scand.», 1963, Suppl. 166, 94 p.
- Dallner G., Ernster L.* Subfractionation and composition of microsomal membranes: a review. — «J. Histochem. Cytochem.», 1968, v. 16, p. 611—632.
- Darnell J. E., Wull R., Tushinski R. J.* An adenylic acid-rich sequence in messenger RNA of HeLa cells and its possible relationship to reiterated sites of DNA. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1971, v. 68, p. 1321—1325.
- Davis B. J.* Disc electrophoresis. 11. Method and application to human serum proteins. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 121, p. 404—427.
- Detection and isolation of a second acid stable proteinase inhibitor from human bronchial mucus.* — «Hoppe — Seyler's Z. Physiol. Chem.», 1973, Bd 354, S. 923—926. Aut.: K. Hochstrasser, R. Reichert, S. Schwarz, S. Werle.
- Dische L., Shettles L. B.* A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. — «J. Biol. Chem.», 1948, v. 175, p. 595—603.
- Draper O. J., Pollard A. L.* The purification of phenol for paper partition chromatography. — «Science», 1949, v. 109, p. 448—449.
- Eagle H.* Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. — «Science», 1959, v. 130, p. 432—437.
- Earl D. C., Korner A.* The isolation and properties of cardiac ribosomes and polysomes. — «Biochem. J.», 1965, v. 94, p. 721—734.
- Ehrenstein G.* Isolation of RNA from intact Escherichia coli cells. — In: Methods in enzymology, v. 12. New York, 1968, p. 588—596.
- (*Eisenman G.*) Эйзенман Дж. Катион-селективные стеклянные электроды и их применение. — В кн.: Вопросы биофизики. М., 1964, с. 215—265.
- Ekren T.* Distribution of free and membrane-bound ribosomes after corticosterone administration in perfused rat liver. — «Mol. Biol. Reports», 1973, v. 1, p. 161—165.
- Ellman G. L.* Tissue sulphhydryl groups. — «Arch. Biochem.», 1959, v. 82, p. 70—77.
- Emmelot P., Bos C. J., Benedetti E. L.* Studies on plasma membranes: 1. Chemical composition and enzyme content of plasma

- membranes isolated from rat liver. — «Biochem. Biophys. Acta», 1964, v. 90, p. 126—145.
- Enzymic methods for the micro-assay of D-mannose, D-glucose, D-galactose and L-fucose from acid hydrolysates of glycoproteins.* — «Analyt. Biochem.», 1969, v. 31, p. 296—305.
- Aut. P. R. Finch, R. Yuen, H. Schachter, M. A. Moscarello.
- Erdős E. G. Enzymes that inactivate polypeptides.* — «Biochem. Pharmacol.», 1961, v. 8, p. 112—113.
- Falvey A. K., Staehelin T. Structure and function of mammalian ribosomes. 1. Isolation and characterization of active liver ribosome subunits.* — «J. Molec. Biol.», 1970, v. 53, p. 1—19.
- Feinstein G., Gertler A. Isolation of alkaline proteinases from Aspergillus oryzae by one-step affinity chromatography on ovo-inhibitor-sepharose column.* — «Biochem. Biophys. Acta», 1973, v. 309, p. 196—202.
- Felix K. Protamins.* — «Adv. Protein Chem.», 1960, v. 15, p. 1—30.
- Fleck A., Munro H. N. The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation.* — «Biochem. Biophys. Acta», 1962, v. 55, p. 571—583.
- Folk J. E., Glander J. A. Carboxypeptidase B. III. Specific esterase activity.* — «Biochem. Biophys. Acta», 1959, v. 33, p. 570—572.
- Fuller G. C., Langner R. O. Elevation of aortic proline hydroxylase: a biochemical defect in experimental arteriosclerosis.* — «Science», 1970, v. 168, p. 987—988.
- (*Gilman H.*) *Гильман Г.* (ред.) *Синтезы органических препаратов*
Сб. 1, пер. с англ. М., Гос. изд-во иностран. лит-ры. с. 193.
- Glenner G. C., Burtner H. J., Brown G. W. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrasodium salts.* — «J. Histochem. Cytochem.», 1957, v. 5, p. 591—600.
- Graham J. L., Grunbaum B. W. A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate.* — «Am. J. Clin. Path.», 1963, v. 39, p. 567—578.
- Green N. M. Competition among trypsin inhibitors.* — «J. Biol. Chem.», 1953, v. 205, p. 535—551.
- Gustafson A., Alaupovic P., Furman R. H. Studies of the composition and structure of serum lipoproteins: isolation, purification and characterization of very low density lipoproteins in human serum.* — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 596—605.
- Haas E., Goldblatt H., Gipson E. C. Extraction, purification and*

- acetylation of human renin and the production of antirenin to human renin. — «Arch. Biochem.», 1965, v. 110, p. 534—543.
- Haberman E.* Kininogens. — In: Handbuch der Experimentelln. Pharmakologie. Bd 25, Berlin, 1970, S. 250—288.
- Hallinan T., Fleck A., Munro H. N.* Loss of ribonucleic acid into lipid solvents after acid precipitation. — «Biochem. Biophys. Acta», 1963, v. 68, p. 131—133.
- Halme J., Kivirikko K. I., Simons K.* Isolation and partial characterization of highly purified protocollagen proline hydroxylase. — «Biochem. Biophys. Acta», 1970, v. 198, p. 460—470.
- Handel E.* Direct microdetermination of sucrose. — «Analyt. Biochem.», 1968, v. 22, p. 280—283.
- Hannuksela M., Rasmussen O., Uitto J.* Protocollagen proline hydroxylase activity in the skin of patients with connective tissue disorders. — «Scand. J. Clin. Lab. Invest.», 1970, v.113, Suppl: 25, p. 35—40.
- Haschemeyer A. E.* Rates of polypeptide chain assembly in liver in vivo: relation to the mechanism of temperature acclimation in *Opsanus tau*. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1969, v. 62, p. 128—135.
- Haschke R. H., Heilmeyer L. M.* An automated assay for glycogen phosphorylase. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 47, p. 451—456.
- Haskell B. H., Snell E. E.* An improved apotryptophanase assay for pyridoxal phosphate. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 45, p. 567—576.
- Havel R. J., Eder H. A., Bragdon J. H.* The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. — «J. Clin. Invest.», 1955, v. 34, p. 1345—1353.
- Hedrick J., Fischer H.* On the role of pyridoxal-5'-phosphate in phosphorylase. 1. Absence of classical vitamin B₆ dependent enzymatic activities in muscle glycogen phosphorylase. — «Biochemistry (Wash.)», 1965, v. 4, p. 1337—1342.
- Heimburger N., Haupt H., Schwick H. G.* Proteinase inhibitors of human plasma. — In: Proceedings of International research conference on proteinase inhibitors. H. Fritz, H. Tschesche (Eds). New York, 1971, p. 1—24.
- Helmreich E., Cori C.* The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1964, v. 51, p. 131—146.

- Hers H. G.* α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). — «Biochem. J.», 1963, v. 86, p. 11—16.
- Hers H. G.* Glycogen storage disease. — In: Advances in metabolic disorders, R. Levine, R. Luft R. (Eds). v. 1. New York, 1964, p. 1—44.
- Hers H. G., Verne W., Van Hoof F.* The determination of amylo-1,6-glycosidase. — «Europ. J. Biochem.», 1967, v. 2, p. 257—264.
- Heyrovsky A.* A new method for the determination of insulin in plasma and urine. — «Clin. Chem. Acta», 1956, v. 1, p. 470—474.
- Heywood S. M., Dowben R. M., Rich A.* A study of muscle polyribosomes and the coprecipitation of polyribosomes with myosin. — «Biochemistry (Wash.)», 1968, v. 7, p. 3289—3296.
- Hochstrasser K., Feuth H., Stoiner A.* Zur Charakterisierung der sauren stabilen Proteaseinhibitoren aus human Plasma. — «Hoppe—Seyler's Z. Physiol. Chem.», 1973, Bd 354, S. 927—932.
- Hollunger G., Orelund L.* Preparation of soluble monoamine oxidase from pig liver mitochondria. — «Arch. Biochem.», 1970, v. 139, p. 320—328.
- Holmstedt B., Larsson L., Tham R.* Further studies of a spectrophotometric method for the determination of diamine oxidase activity. — «Biochim. Biophys. Acta», 1961, v. 48, p. 182—186.
- Hoof F., Hers H. G.* The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidoses. — «Europ. J. Biochem.», 1968, v. 7, p. 34—44.
- Huijing F.* A rapid enzyme method for glycogen estimation in very small tissue samples. — «Clin. Chem. Acta», 1970, v. 30, p. 567—572.
- Hurlbert R. B., Potter V. R.* A survey of the metabolism of orotic acid in the rat. — «J. Biol. Chem.», 1952, v. 195, p. 257—270.
- Hutton J. J., Tappel A. L., Udenfriend S.* A rapid assay for collagen proline hydroxylase. — «Analyt. Biochem.», 1966, v. 16, p. 384—390.
- Illingworth B., Cori G. T.* Crystalline muscle phosphorylase. — «Biochem. Preparations», 1953, v. 3, p. 1—9.
- Immunochemical precipitation of polyribosomes.* — «Biochem. Biophys. Acta», 1971, v. 247, p. 104—108. Aut.: C. Holme, T. L. Delovitch, S. L. Boyd, A. H. Schon.
- Increased efficiency of exogenous messenger RNA-translation in a*

- Krebs ascites cell lysate. — «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 1972, v. 69, p. 1299—1303. Aut.: S. Metafora, M. Terada, L. W. Dow, P. A. Marks, A. Bank.
- Jakoby W. B.* A technique for the crystallization of proteins. — «Analyt. Biochem.», 1968, v. 26, p. 295—298.
- Johns E. W.* Studies on histones. — «Biochem. J.», 1964, v. 92, p. 55—59.
- Juva K., Prockop D. J.* Modified procedure for the assay of H^3 -or C^{14} -labeled hydroxyproline. — «Analyt. Biochem.», 1966, v. 15, p. 77—83.
- Kalkar H. M.* Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. 111. Studies of the enzymes of purine metabolism. — «J. Biol. Chem.», 1947, v. 167, p. 461—481.
- Kallikrein-bradykinin* system in chronic alcoholic liver disease. — «Ann. intern. Med.», 1972, v. 77, p. 205—209. Aut.: P. Wong, R. W. Colman, R. C. Talamo, B. M. Babior.
- Katz S., Comb D. G.* A new method for the determination of the base composition of ribonucleic acid. — «J. Biol. Chem.», 1963, v. 238, p. 3065—3067.
- (*Kennell D.*) *Кеннел Д.* Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка. — В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 138—144.
- Khuri Raja N.* Glass microelectrodes and their uses in biological systems. — In: Glass electrodes for hydrogen and other cations. Ed. G. Eisenman. New York, 1967, p. 479—519.
- Kivirikko K. J., Prockop D. J.* Purification and partial characterization of the enzyme for the hydroxylation of proline in procollagen. — «Arch. Biochem.», 1967, v. 118, p. 611—618.
- Korn E. D.* The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro. — In: «Methods of Biochemical Analysis», v. 7, Ed. D. Glick. New York, 1959, p. 145—192.
- Korner A.* Incorporation of radioactive amino acids into serum albumin by isolated rat liver ribosomes. — «Biochem. J.», 1962, v. 83, p. 69—74.
- Krebs H. A.* Body size and tissue respiration. — «Biochem. Biophys. Acta», 1950, v. 4, p. 249—269.
- Krisman C. R.* A method for the colorimetric estimation of glyco-gen with the iodine. — «Analyt. Biochem.», 1962, v. 4, p. 17—23.

- Lange R. J., Smith E. L.* Histones: structure and function. — «Ann. Rev. Biochem.», 1971, v. 40, p. 279—314.
- Laurell C. B., Eriksson S.* The serum α_1 -antitrypsin in families with hypo- α_1 -antitrypsinemia. — «Clin. Chem. Acta», 1965, v. 11, p. 395—402.
- Levi-Montalcini R., Hamburger V.* A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotisation of the chick embryo. — «J. Exp. Zool.», 1953, v. 123, p. 253—288.
- Lewis J. A., Tata J. R.* A rapidly sedimenting fraction of rat liver endoplasmic reticulum. — «J. Cell Sci.», 1973, v. 13, p. 447—461.
- Lindberg V., Persson T.* Isolation of mRNA from KB-cells by affinity chromatography on polyuridylic acid covalently linked to sepharose. — «Europ. J. Biochem.», 1972, v. 31, p. 246—254.
- Lindgren F. T., Jensen L. C.* The isolation and quantitative analysis of serum lipoproteins. — In: Blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition and metabolism. Ed. G. J. Nelson. New York, 1972, p. 181—274.
- Mason M., Fasella P.* Assay of glycogen phosphorylase by differential spectropolarimetry. — «Analyt. Biochem.», 1971, v. 43, p. 57—65.
- Mathews R. W., Oronsky A., Haschemeyer A. E.* Effect of thyroid hormone on polypeptide chain assembly kinetics in liver protein synthesis in vivo. — «J. Biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 1329—1333.
- (*Maurer H. R.*) *Маурер Г.* Диск-электрофорез. Пер. с нем. М., «Мир», 1971, 62 с.
- Martin T. E.* A simple general method to determine the proportion of active ribosomes in eucaryotic cells. — «Exp. Cell Res.», 1973, v. 80, p. 496—498.
- McCormick D. B., Gregory M. E.* Pyridoxal phosphokinase. 1. Assay distribution, purification and properties. — «J. Biol. Chem.», 1961, v. 236, p. 2076—2084.
- McCormick D. B., Snell E. E.* Pyridoxal kinases (ATP: pyridoxal 5-phosphotransferase, EC 2.7.1.35) from bacteria and from mammalian tissues. — In: Methods in enzymology. v. 18. Vitamins and coenzymes. D. B. McCormick, L. D. Wright (Eds), New York, 1970, p. 611—619.
- Mihalyi E., Godfrey J. E.* Digestion of fibrinogen by trypsin. 1. Kinetic studies of the reaction. — «Biochem. Biophys. Acta»,

- 1963, v. 67, p. 73—89.
- Moore S., Stein W. H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. — *J. Biol. Chem.*, 1954, v. 211, p. 907—913.
- Motokawa J., Kikuchi G. Glycine metabolism in rat liver mitochondria. — *Arch. Biochem.*, 1971, v. 146, p. 461—466.
- Murray K. The basic proteins in cell nuclei. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1965, v. 34, p. 209—238.
- Nash T. Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. — *Biochem. J.*, 1953, v. 55, p. 416—421.
- Nelson N. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. — *J. Biol. Chem.*, 1944, v. 153, p. 375—380.
- Neuman R. E., Logan M. A. The determination of hydroxyproline. — *J. Biol. Chem.*, 1950, v. 184, p. 299—306.
- Neville D. M. The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, v. 8, p. 413—421.
- (Northrop J., Kunitz M., Herriott R.) Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты. Пер. с англ. М., Изд-во иностран. лит-ры, 1950, с. 297.
- Nowell P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. — *Cancer Res.*, 1960, v. 20, p. 462—466.
- Ohman R., Ekelund P., Svennerholm L. The diagnosis of Tay—Sachs disease. — *Acta Paediat. Scand.*, 1971, v. 60, p. 399—406.
- Okada K., Fujii S., Wada M. Microassay of pyridoxal phosphate using tryptophan-¹⁴C with tryptophanase. — In: *Methods in Enzymology*. v. 18. Vitamins and coenzymes. McCormick D., Wright L. D. (Eds). New York, 1970, p. 505—509.
- Okada S., O'Brien J. Tay—Sachs disease. Generalized absence of a B-D-N-acetylhexosaminidase component. — *Science*, 1969, v. 165, p. 698—700.
- Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. 11. Solubilization, purification and properties. — *J. Biol. Chem.*, 1964, v. 239, p. 2379—2385.
- On the lability of poly A sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, v. 262, p. 220—226. Aut.: R. P. Perry, J. La Torre, D. E. Kelley, J. R. Greenberg.
- Oreland L. Purification and properties of pig liver mitochondrial

- monoamine oxidase. — «Arch. Biochem.», 1971, v. 146, p. 410—421.
- Osborn M. J., Huennekens F. M.* Participation of anhydroleucovorin in the hydroxymethyl tetrahydrofolic dehydrogenase system. — «Biochem. Biophys. Acta», 1957, v. 26, p. 646—649.
- Osgood E., Brooke J. H.* Continuous tissue culture of leucocytes from human leucemic bloods by application of «gradient» principles. — «Blood», 1955, v. 10, p. 1010—1018.
- Oss C. J. Van, Bronson P. M.* Characteristics of protein concentrating anisotropic cellulose acetate membrane. — «Separation Sci.», 1970, v. 7, p. 63—75.
- Oxidation of p-dimethylaminomethylbenzylamine by pig kidney diamine oxidase. A new spectrophotometric assay.* — «Biochem. J.», 1972, v. 127, p. 875—879. Aut.: W. G. Bardsley, M. J. Grabbe, J. S. Schindler, J. S. Ashford.
- Palmiter R., Oka T., Schimke R.* Modulation of ovalbumin synthesis by estradiol-17 and actinomycin D as studied in explants of chick oviduct in culture. — «J. Biol. Chem.», 1971, v. 246, p. 724—737.
- Palmiter R., Palacios R., Schimke R. T.* Identification and isolation of ovalbumin—synthesizing polysomes. 11. Quantification and immunoprecipitation of polysomes. — «J. Biol. Chem.», 1972, v. 247, p. 3296—3304.
- Palter K., Lukton A.* A titrimetric assay for glycogen phosphorylase. — «Analyt. Biochem.», 1973, v. 53, p. 613—623.
- Peralta S.* Argininuria, convulsiones y oligofrenia, un nuevo error innato del metabolismo? — «Rev. Clin. Esp.», 1965, v. 97, p. 176—184.
- Percheron M. F.* Dosage colorimetrique du fructose et des fructofuranosides par l'acide thiobarbiturique. — «C. R. Acad. Sci. (Paris)», 1962, v. 255, p. 2521—2522.
- Peterkofsky B., Diegelman R. F.* Use of a mixture of proteinasefree collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. — «Biochemistry (Wash.)», 1971, v. 10, p. 988—994.
- Peterson E. A.* Cellulosic ion exchangers. — In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. E. S. Work, E. Work (Eds). Amsterdam, 1970, p. 163.
- Phillips D. M., Johns E. W.* A fractionation of the histones of group F_{2a} from calf thymus. — «Biochem. J.», 1965, v. 94,

p. 127—130.

- Phillips G. R., West J.* Purification of protamine sulphate for the quantitative precipitation of ribonucleic acids. — «Biochem. Biophys. Acta», 1964, v. 91, p. 416—420.
- Piquilloud J., Reinharz A., Roth M.* Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. — «Biochem. Biophys. Acta», 1970, v. 206, p. 136—142.
- Portnoy H. D., Thomas L. M., Gurdjian E. S.* Measuring cation activity of living brain. — «Arch. Neurol. (Chic.)», 1963, v. 8, p. 597—607.
- Potter M., Appela E., Geiser S.* Variations in the heavy polypeptide chain. Structure of gamma myeloma immunoglobulins from an inbred strain of mice and a hypothesis as to their origin. — «J. Molec. Biol.», 1965, v. 14, p. 361—372.
- Prockop D. J., Fbert P. S.* A simple method for differential assay of tritium and carbon-14 in water-soluble biological materials. — «Analyt. Biochem.», 1963, v. 6, p. 263—271.
- Prockop D. J., Udenfriend S.* A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissue and urine. — «Analyt. Biochem.», 1960, v. 1, p. 228—239.
- Protein measurement with Folin phenol reagent.* — «J. Biol. Chem.», 1951, v. 193, p. 265—275. Aut.: O. H. Lowry, N. F. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall.
- Protocollagen* proline hydroxylase activity in experimental pulmonary fibrosis of rat. — «J. Lab. Clin. Med.», 1970, v. 75, p. 535—541. Aut.: J. Halme, J. Uitto, K. Kahanpaa, P. Karhuneu, S. Lindy.
- Reardon J., Foreman J. A., Searcy R. L.* New reactants for the colorimetric determination of ammonia. — «Clin. Chem. Acta», 1966, v. 14, p. 403—405.
- Recknagel R. O., Choshal A. K.* Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids by carbon tetrachloride. — «Nature», 1966, v. 210, p. 1162—1163.
- Rigas D., Johnson E.* Studies on the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* and its mitogenicity. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, v. 113, p. 800—813.
- Robyt J. F., Ackerman R. J., Chittenden C. G.* Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: a case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in *Aspergillus oryzae* α -amylase, papain and lysozyme. — «Arch. Biochem.», 1971,

v. 147, p. 262—269.

- Roering D. L., Mascaro L., Aust S. D.* Microsomal electron transport: tetrazolium reduction by rat liver microsomal NADPH — cytochrome c reductase. — *Arch. Biochem.*, 1972, v. 153, p. 475—479.
- Salk J. E.* A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. — *J. Immunol.*, 1944, v. 49, p. 87—98.
- Sanger F.* Fractionation of oxidized insulin. — *Biochem. J.*, 1949, v. 44, p. 126—128.
- Sauer L. A., Burrow G. N.* The submicrosomal distribution of radio active proteins released by puromycin from the bound ribosomes of rat liver microsomes labelled in vitro. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, v. 277, p. 179—187.
- Scely J. H., Petitclerc L. C., Benoiton L.* Interference by protein and amines in the determination of ammonia by the isocyanurate method. — *Clin. Chem. Acta*, 1967, v. 18, p. 85—86.
- Schirch L. V., Mason M.* Serine transhydroxymethylase: spectral properties of the enzyme-bound pyridoxal-5-phosphate. — *J. Biol. Chem.*, 1963, v. 238, p. 1302—1311.
- Schlunk F. F., Longnecker D. S., Lombardi B.* On the ethionine — induced inhibition of protein synthesis in male and female rats — lack of effect on intestinal mucosa. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, v. 158, p. 425—434.
- Schmidt G., Thannhauser S. J.* A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphorproteins in animal tissues. — *J. Biol. Chem.*, 1945, v. 161, p. 83—89.
- Schneider C. W.* Intracellular distribution of enzymes. 111. The oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. — *J. Biol. Chem.*, 1948, v. 176, p. 259—266.
- Schreier M. H., Staehelin T.* Initiation of mammalian protein synthesis: the importance of ribosome and initiation factor quality for the efficiency of in vitro systems. — *J. Molec. Biol.*, 1973, v. 73, p. 329—349.
- Schwartz A. M., Perry J. W., Berch J.* Surface active agents and detergents. v. 2. New York, 1958, 576 p.
- Shafritz D. A., Anderson W. F.* Isolation and partial characterization of reticulocyte factors M₁ and M₂ — *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, p. 5553—5559.
- Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J.* Molecular weight estimation

- of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel. — *«Biochem. Biophys. Res. Commun.»*, 1967, v. 28, p. 815—820.
- Sheldon R., Jurale C., Kates J.* Detection of polyadenylic acid sequences in viral and eukaryotic RNA. — *«Proc. Nat. Acad. Sci. USA»*, 1972, v. 69, p. 417—421.
- Shulman N. R.* A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. — *«J. Biol. Chem.»*, 1955, v. 213, p. 655—671.
- Smiley K. L., Berry A. J., Suelter C. H.* An improved purification, crystallization and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. — *«J. Biol. Chem.»*, 1967, v. 242, p. 2502—2506.
- Stegemann H.* Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. — *«Hoppe. — Seylers Z. physiol. Chem.»*, 1958, Bd 311, S. 41—45.
- Stein W. H.* A chromatographic investigation of the amino acid constituents of normal urine. — *«J. Biol. Chem.»*, 1953, v. 201, p. 45—49.
- Stein W. H., Moore S.* The free amino acids of human blood plasma. — *«J. Biol. Chem.»*, 1954, v. 211, p. 915—928.
- Straus W.* Colorimetric determination of cytochrome c oxidase by formation of a quinonediimonium pigment from dimethyl-p-phenylenediamine. — *«Biochem. Biophys. Acta»*, 1956, v. 19, p. 58—65.
- Studies on normal and leukemic leukocytes. IV. Tetrahydrofolate-dependent enzyme systems and dihydrofolic reductase.* — *«J. Clin. Invest.»*, 1963, v. 42, p. 1899—1907. Aut.: J. R. Bertino, J. Silber, A. Frieman, A. Alenty, M. Albrecht, B. M. Gabrio, F. M. Huennekens.
- Sulis A., Alessio L., Manucci P.* Cello gel electrophoresis of hemoglobins. — *«Clin. Chem. Acta»*, 1968, v. 20, p. 449—453.
- Summer R. J.* Lipoid oxidase studies — a method for the determination of lipoxidase activity. — *«Ind. Eng. Chem.»*, 1943, v. 15, p. 14—15.
- Sundaresan P. R., Coursin D. B.* Microassay of pyridoxal phosphate using L-tyrosine-1-¹⁴C and tyrosine apodecarboxylase. — In: *Methods in enzymology*. v. 18. Vitamins and coenzymes. D. B. McCormick, L. D. Wright (Eds). New York, 1970, p. 509—512.
- Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous*

- ions. — «J. Biol. Chem.», 1963, v. 238, p. 828—835. Aut.: F. E. Hunter, J. M. Gebecki, P. E. Hoffsten, J. Weinstein, A. Scott.
- Synthetic* polypeptides as substrates and inhibitors of collagen proline hydroxylase. — «Arch. Biochem.», 1968, v. 125, p. 779—789. Aut.: J. J. Hutton, A. Marglin, B. Witkop, J. Kurtz, A. Berger, S. Udenfriend.
- Tabor C. W., Tabor H., Ronethal S. M.* Purification of amine oxidase from beef plasma. — «J. Biol. Chem.», 1954, v. 208, p. 645—661.
- Takeuchi M., Terayama H.* Preparation and chemical composition of rat liver cell membranes. — «Exp. Cell Res.», 1965, v. 40, p. 32—44.
- Takeuchi T., Kivirikko K. I., Prockop D. J.* Increased protocollagen hydroxylase activity in the liver of rat with hepatic fibrosis. — «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1967, v. 28, p. 940—944.
- Tata J. R.* Preparation and properties of microsomal and submicrosomal fractions from animal cells. — In: Subcellular components. Preparation and fractionation. Birnie G. D., Fox S. M. (Eds). London, 1969, p. 83—107.
- Tay-Sachs disease.* Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay. — «New Engl. J. Med.», 1970, v. 283, p. 15—20. Aut.: J. S. O'Brien, S. Okada, A. Chen, D. L. Fillerup.
- Thomson W. H.* Skeletal muscle glycogenesis: an investigation of two dissimilar cases. — «J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.», 1963, v. 26, p. 60—67.
- Tiselius A., Hjerten S., Levin O.* Protein chromatography on calcium phosphate columns. — «Arch. Biochem.», 1956, v. 65, p. 132—135.
- Trautschold I., Werle E.* Assay methods in the kinin system. — In Handbook of Exptl. Pathology, 1970, v. 25, p. 52—81.
- (*Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.*) *Умбрейт В. В., Буррис Р. Х., Штауффер Дж. Ф.* Манометрические методы изучения тканевого обмена. Пер. с англ. М., Изд-во иностран. лит-ры, 1951, с. 296.
- Varon S., Nomura J., Shooter E. M.* Isolation of mouse nerve growth factor of high molecular weight form. — «Biochemistry (Wash.)», 1967, v. 6, p. 2202—2213.
- Wang P., Esmann V.* A new assay of phosphorylase based of the filter paper technique. — «Analyt. Biochem.», 1972, v. 47,

p. 495—500.

- Wannemacher R. W., Wannemacher C. I., Yatvin M. B.* Amino acid regulation of synthesis of ribonucleic acid and protein in the liver of rats. — «Biochem. J.», 1971, v. 124, p. 385—390.
- Werle E., Zickgraf-Rudel G.* Natural proteinase inhibitors. Distribution, specificity, mode of action and physiological significance. — «Z. Klin. Chem.», 1972, Bd 10, S. 139—150.
- Wettenhall R. E. H., Woore G., Sherton C. C.* Two physically and functionally distinct forms of eucaryotic 40S ribosomal subunits. «Biochemistry (Wash.)», 1973, v. 12, p. 2403—2411.
- Whistler R. L., Durso D. F.* Chromatographic separation of sugars on charcoal. — «J. Am. Chem. Soc.», 1950, v. 72, p. 677—679.
- Wolff E. C., Schirmer E. W., Folk J. E.* The kinetics of carboxypeptidase B activity. 1. Kinetic parameters. — «J. Biol. Chem.», 1962, v. 237, p. 3094—3099.
- Yang H. Y.T., Erdös E. G., Levin J.* A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. — «Biochem. Biophys. Acta», 1970, v. 214, p. 374—376.
- Zak R., Rabinowitz M., Platt C.* Ribonucleic acids associated with myofibrils. — «Biochemistry (Wash.)», 1967, v. 6, p. 2493—2499.
- Zeller E. A.* Diamine oxidase: specificity and mechanism. — «Adv. Biochem. Psychopharm.», 1972, v. 5, p. 167—180.
- Ziegler D. M., Pettit F. H.* Formation of an intermediate N-oxide in the oxidative demethylation of N,N-dimethylaniline catalyzed by liver microsomes. — «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 1964, v. 15, p. 188—192.

中科院植物所图书馆



S0017410

收到期	82年7月
来源	33.96(2244)
书价	1.10
单据号	8854
开票日期	82.7.22

现代生物化学方法

〔苏〕B.H. 奥列霍维奇等编著

袁厚积 赵邦悌 合译

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京新华印刷厂印装

*

开本 850×1168 1/32 印张 12 字数 289,000

1980年9月第1版 1981年9月第1次印刷

印数 00,001—7,000

书号 13012·0514 定价 1.10 元

58.173

653

(1)

012096

现代生物化学方法

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
	程红英	91.10.10	

012096



书号 13012 · 0514

定价 1.10 元